

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Determinação do custo biológico em isolados de *Mycobacterium tuberculosis*
com mutações nos genes *rpsL*, *rrs*, *gidB*, *rpoB* e *katG*

Fernanda Sá Spies

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da UFRGS como
requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor
em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Co-orientador: Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva

Porto Alegre, junho de 2011.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado em quatro instituições distintas: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia; na Universidade Federal do Rio Grande (FURG), no laboratório de Micobactérias; na Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) e no *Institute of Tropical Medicine* (Antuérpia-Bélgica), principalmente no *Mycobacteriology Unit*.

Este trabalho teve o financiamento do edital universal do CNPq número 473124/2007-6 e também o apoio financeiro na forma de bolsa do CNPq.

Agradecimentos

Primeiro de tudo eu gostaria de agradecer ao meu orientador Arnaldo Zaha e ao meu co-orientador Pedro E. Almeida da Silva pela oportunidade de realizar esses estudos, por todo o auxílio, incentivo, ensinamentos e dedicação na orientação deste trabalho.

Agradecimentos especiais a Maria Lucia Rossetti por me receber em seu laboratório onde a maior parte da pesquisa de bancada foi realizada, e também a Juan Carlos Palomino e Anandi Martin por me receberem tão bem na Bélgica e me ajudarem na pesquisa tanto com o material necessário como também com muito incentivo e carinho.

Gostaria também de agradecer a todas as pessoas de todos os laboratórios por onde passei nesse doutorado, que não foram poucos!!!

Agradeço as colegas lá da FURG e em especial a Daniela Ramos, que me ajudou muito com os MICs e a Andrea que me ensinou as técnicas de fitness. Os colegas de doutorado lá da genética da UFRGS, em especial a Deise e a Vanessa (minhas colegas também de mestrado) e do BIOTEC, em especial a Lia que me ajudou muito com o sequenciamento. Gostaria de agradecer o pessoal do ITM que me recebeu super bem, em especial a Estel pela ótima amizade, a Maira pela companhia, e aos técnicos Kista e Harry. E por último ao pessoal do CDCT e do LACEN, em especial a Marta pelas cepas que foram estudadas, a Sabrina pela ajuda nas análises estatísticas e por último ainda às minhas grandes amigas de bancada, de happy-hour, caminhadas na ESEF...que conheci no CDCT: Andrezza, Franciele, Lia, Luciana, Patrícia, Raquel e Tais.

Aos secretários da pós, em especial ao Elmo, por estar sempre super disposto a ajudar e informar os alunos.

Agradeço também ao CNPq pelo apoio financeiro a minha pesquisa com o edital universal, a bolsa de doutorado, taxa de bancada e pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche.

E para finalizar a minha família, que sempre, sempre, sempre me entendeu, apoiou, incentivou, torceu e orgulhou-se muito de mim, obrigada pai e mãe! A minha queridíssima irmã que ainda por cima me ajudou a conferir os textos e animou meus Power-points!!!

E gostaria de um agradecimento mais do que especial ao meu querido e muito amado namorado Filipe pelo amor incondicional, por todo o apoio e incentivo, mesmo quando eu mesma nem me apoiaria e me incentivaria!

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	5
Resumo	7
Abstract.....	8
Capítulo 1 Introdução	10
Tuberculose e epidemiologia.....	11
Agente etiológico e características da infecção.....	14
Transmissão e sintomas	15
Tratamento.....	16
Resistência aos fármacos	17
Rifampicina	19
Isoniazida.....	19
Estreptomicina	20
Kanamicina e Capreomicina.....	20
Ofloxacina	21
Epidemiologia Molecular	21
<i>Fitness</i>	26
Justificativa.....	31
Objetivos.....	32
Capítulo 2 Resistência à estreptomicina e polimorfismos linhagem específicos no gene <i>gidB</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	41
Capítulo 3 <i>Fitness</i> em isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> com mutações nos genes <i>rpsL</i> , <i>rpoB</i> e <i>katG</i> medido pelo ensaio de redução quantitativa da resazurina	58
Capítulo 4 <i>Fitness</i> em isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> com mutações no genes <i>rpsL</i> , <i>rrs</i> , <i>gidB</i> and <i>rpoB</i>	73
Capítulo 5 Discussão Geral e Perspectivas	94
Capítulo 6 Anexo.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

AMK	amikacina
BCG	bacilo Calmette-Guérin
CAP	capreomicina
DNA	ácido desoxirribonucléico
DR	repetição direta
EMB	etambutol
ETH	etionamida
FQ	fluoroquinolonas
HIV/AIDS	vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência adquirida
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
INH	isoniazida
IS	sequência de inserção
KAN	kanamicina
LAM	<i>Latin America Mediterranean</i>
LSP	polimorfismos de sequências grandes
MDR	multidroga resistente
MGIT	<i>mycobacterial growth indicator tube</i>
MIC	concentração mínima inibitória
MIRU-VNTR	unidade de repetição de micobactéria- repetição em tandem de número variável
mRNA	RNA mensageiro
NAD	nicotinanida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotideo reduzido
OFL	ofloxacina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	ácido para-amino salicílico
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PZA	pirazinamida

QRDR regiões que determinam a resistência às quinolonas
REMA ensaio em microplaca com resazurina
RFLP polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição
RIF rifampicina
rRNA RNA ribossômico
RNA ácido ribonucléico
SNP polimorfismo de único nucleotídeo
STR estreptomicina
SVS secretaria de vigilância em saúde
TB tuberculose
XDR cepas extensivamente resistentes às drogas

RESUMO

Uma vez que poucas drogas são ativas frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, torna-se muito importante se conhecer os mecanismos que levam a resistência e, embora, tenha-se aprendido muito sobre a resistência, ainda existem alguns antimicrobianos onde esse mecanismo não está completamente elucidado. A aquisição da resistência aos antimicrobianos em bactérias, por sua vez, é frequentemente associada com a perda de *fitness* e é muito importante a determinação do *fitness* na população, já que, ele pode influenciar a o futuro da epidemia de isolados resistentes a múltiplas drogas.

As mutações associadas com a resistência a estreptomicina nos genes *rpsL* e *rrs* são bem conhecidas e podem explicar em torno de 70% da resistência fenotípica. Mutações no gene *gidB* foram descritas recentemente em isolados clínicos de *M. tuberculosis* como associadas com a resistência a baixas concentrações de estreptomicina. Nesse estudo, mutações em *gidB* ocorreram em 27% das cepas resistentes a estreptomicina sem mutações nos genes *rpsL* e *rrs*. Duas mutações foram consideradas polimorfismos, *gidB16* (alelo 16G) foi identificado exclusivamente no genótipo *Latin American Mediterranean*, enquanto que *gidB92* (alelo 92C) foi associado com a linhagem Beijing.

O *fitness* de 21 cepas multidroga resistentes de *M. tuberculosis* foi estudado através do método de quantificação da redução da resazurina, enquanto o *fitness* de 78 cepas foi estudado através de curvas de crescimento utilizando o *mycobacterial growth indicator tube* e estudos de competição com alguns isolados selecionados. Em geral, analisando-se as curvas de crescimento, em ambos os estudos as cepas com mutações K43R em *rpsL* e S531L em *rpoB* ou cresceram melhor ou sem diferença do isolado sensível, já os isolados com mutações em *rpoB*- não em S531L e com mutações em mais de um gene cresceram em média mais lentamente que os isolados sensíveis. Quanto às diferentes linhagens, no primeiro estudo, os isolados classificados como *Latin American Mediterranean* cresceram mais rápido no parâmetro tamanho da fase *lag*, mas sem nenhuma diferença na fase logarítmica, já no segundo estudo, o resultado foi diferente, as cepas não-*Latin American Mediterranean* cresceram em média mais rapidamente, mas sem diferença estatística das cepas *Latin American Mediterranean*, e também cresceram melhor nos ensaios de competição. O *fitness* dos isolados clínicos estudados é muito heterogêneo, possivelmente devido ao fato desses isolados apresentarem diferentes graus de resistência às drogas,

diferentes mutações nos genes e ainda diferentes genótipos. Em ambos os estudos foi possível afirmar que as mutações mais encontradas em isolados clínicos são as mutações não relacionadas com a perda do *fitness* ou que geram pouco custo biológico ao isolado.

ABSTRACT

Since few drugs are active against the *Mycobacterium tuberculosis*, it is very important to know the mechanisms that lead to resistance and, although much has been learned about the resistance, there are still some antimicrobials where it is not fully understood. The acquisition of antimicrobial resistance in bacteria is often associated with a loss in fitness and it is very important to have the fitness determined in the population, since it can influence the future of the multidrug isolates epidemic.

Mutations related to streptomycin-resistance in the *rpsL* and *rrs* genes are well known and can explain about 70% of the phenotypic resistance. Mutations in the *gidB* gene were described recently as being associated with resistance to low concentrations of streptomycin in strains of *M. tuberculosis*. In this study, mutations in *gidB* occurred in 27% of streptomycin-resistant strains without mutations in the *rrs* and *rpsL* genes. Two mutations were considered polymorphisms, *gidB16* (16G allele) was found exclusively in Latin American Mediterranean genotype, while *gidB92* (92C allele) was associated with Beijing lineage in another population.

The fitness of 21 multidrug resistant strains of *M. tuberculosis* was studied by the method of quantitative resazurin reduction assay and fitness of 78 strains was studied by growth curves in mycobacterial growth indicator tube and competition assays using some selected strains. In general, analyzing the growth curves in both studies the strains with the mutations *rpsL* K43R and *rpoB* S531L grew better or with no difference from the susceptible strain, on the other hand, strains with mutations in *rpoB*-but not S531L and with mutations in more than one gene grew, on average, more slowly than susceptible ones. Regarding the different lineages from the first study, strains classified as Latin American Mediterranean grew faster in the parameter of the lag phase, but with no difference in the logarithmic phase. In the second study, the outcome was different, non-Latin American Mediterranean strains grew faster on average, but with no statistical

difference from Latin American Mediterranean strains, and also grew well in the competition assays. The fitness of the clinical isolates studied is very heterogeneous, possibly because these isolates present varying degrees of drug resistance, different mutations in the genes analyzed and even different genotypes. In both studies we can say that the frequently mutations found in clinical isolates are the mutations related with no fitness cost or that generate little fitness cost.

Capítulo 1

Introdução

INTRODUÇÃO

Tuberculose e epidemiologia

O agente etiológico causador da tuberculose (TB) em humanos foi descoberto por Robert Koch. Ele concluiu que essa doença era infecciosa, pois preenchia todos os postulados para a definição de agentes microbiológicos: o bacilo era visualizado nos tecidos afetados pela doença, poderia ser cultivado em meio de cultura sólido estéril e cobaias desenvolveram a doença depois de inoculadas com o agente causador, o que não ocorreu com as cobaias que não sofreram a inoculação (Kaufmann and Schaible, 2005).

Em 24 de março de 1882 em Berlin, Robert Koch apresentou seu trabalho sobre a TB que lhe rendeu o prêmio Nobel em 1905. Nessa época a doença era o maior problema de saúde na Europa (Kaufmann and Schaible, 2005) e seu tratamento era realizado em sanatórios, onde as pessoas doentes descansavam, recebiam dietas saudáveis e respiravam ar fresco (Daniel, 2006).

Uma medida mais direta para a saúde pública foi tomada por Albert Calmette e Camille Guérin. Eles desenvolveram uma vacina contra a TB de uma cepa atenuada de *M. bovis* que foi chamada de bacilo Calmette-Guérin (BCG) e testada, em 1921, em uma criança que havia nascido de uma mãe morrendo de tuberculose e cuidada por uma avó também doente. A criança sobreviveu e não desenvolveu a doença e nos próximos anos muitas outras crianças foram imunizadas (Daniel, 2006).

Algumas décadas depois a história da TB mudou drasticamente com a introdução da quimioterapia. Albert Schatz e Selman Waksman descobriram a primeira droga efetiva frente à TB, a estreptomicina (STR), do *Streptomyces griseus* em 1944. Em 1946, Lehmann descobriu o ácido para-amino salicílico (PAS) e em seguida foi descoberta a isoniazida (INH) por três diferentes companhias, simultaneamente: Hoffman LaRoche, E.R. Squibb & Sons e Bayer. A pirazinamida (PZA) foi descoberta em 1952, a etionamida (ETH) em 1956 e o etambutol (EMB) em 1961 (Zhang, 2005). As décadas de 50 e 60 representaram a época de ouro para a descoberta de drogas anti-TB, já que a maioria das drogas usadas até hoje foram descobertas naquela época (Zhang, 2005).

No século que se segue à descoberta de Koch testemunhou-se um firme declínio da TB devido ao desenvolvimento da quimioterapia, exame de raios-X, programa de imunização com BCG, melhorias nas condições socioeconômicas e à pasteurização do

leite. Estas novas tecnologias determinaram uma sensível redução do número de casos de TB nos países economicamente desenvolvidos. Entretanto, no final do século XX, houve um aumento no número de casos da doença em todo o mundo, sendo a TB considerada uma emergência global em 1993, pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Taylor *et al.*, 2003).

Acredita-se que vários fatores contribuíram para esse quadro: o aumento da resistência aos antimicrobianos utilizados na quimioterapia, a epidemia do vírus da imunodeficiência humana/ síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) no início dos anos 80, o aumento de usuários de drogas injetáveis, o aumento da migração, transmissão ativa em ambientes com aglomeração humana (como prisões, hospitais, abrigos para pessoas de rua, favelas) e a degradação dos sistemas de saúde (Ducati *et al.*, 2006).

Embora a TB possa ser considerada uma doença reemergente em alguns países europeus e nos Estados Unidos, no Brasil ela não é um problema de saúde pública emergente e tampouco reemergente. Ela é um problema presente desde muito tempo (Ruffino-Netto, 2002).

A TB é uma doença contagiosa e transmitida por via aérea, está relacionada à pobreza e afeta principalmente jovens adultos em seus anos de vida mais produtivos. A grande maioria de mortes relacionadas à TB ocorre no mundo em desenvolvimento (Figura 1). Dados da OMS estimam que em 2009, 1,7 milhões de pessoas morreram em decorrência dessa doença no mundo, o que equivale a 4.700 mortes decorrentes da tuberculose no mundo por dia. Houve 9,4 milhões de novos casos de TB, sendo que a estimativa da incidência global caiu para 137 casos por 100.000 habitantes, após um pico de 142 casos por 100.000 habitantes em 2004. Esse número vem caindo nos últimos anos, embora muito vagarosamente. A estimativa é de 440.000 novos casos de MDR-TB (tuberculose resistente à rifampicina (RIF) e isoniazida) e 150.000 mortes decorrentes desse tipo de TB. Alguns países da antiga União Soviética alcançaram taxas de 28% de novos casos de TB como sendo MDR (WHO, 2010). Pelo menos um caso de XDR-TB (MDR mais resistência a drogas de segunda linha) já foi reportado por 69 países, incluindo o Brasil (WHO, 2011).

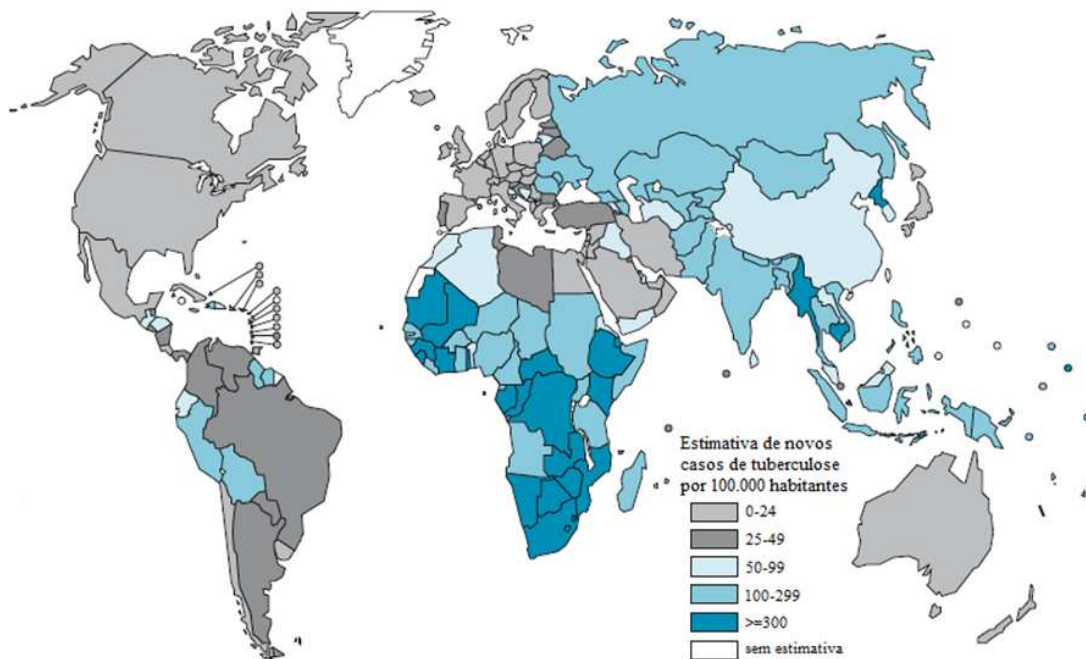


Figura 1. Taxas estimadas de novos casos de tuberculose por país em 2009. Adaptado de WHO, 2010.

O Brasil faz parte do grupo dos 22 países onde juntos ocorrem 81% dos casos de TB no mundo. Os cinco países com a maior incidência de casos de TB em 2009 foram Índia (1,6-2,4 milhões), China (1,1-1,5 milhões), África do Sul (0,4-0,6 milhões), Nigéria (0,37-0,55 milhões) e Indonésia (0,35-0,52 milhões). O Brasil ocupa o 19º lugar nesse ranking (WHO, 2010).

No Brasil, em 2009, a incidência de TB foi de 87 casos por 100.000 habitantes, em torno de 72.000 novos casos foram notificados da doença em 2009 e 387 foram casos confirmados como sendo MDR-TB, a maior taxa de TB acometeu homens e mulheres entre 25-34 anos de idade (WHO, 2010).

Dados da secretaria de vigilância em saúde (SVS) afirmam que no estado do Rio Grande do Sul a incidência de casos é de 48/100.000 habitantes, e que esse é o quarto estado com maior número de casos no Brasil. Quando as capitais brasileiras são estudadas, Porto Alegre (capital do estado do Rio Grande do Sul) é a capital com maior incidência da doença, com 118 casos por 100.000 habitantes (SVS, 2010).

Agente etiológico e características da infecção

O principal agente etiológico causador da TB em humanos é o *Mycobacterium tuberculosis*, que é uma bactéria patogênica aeróbica que estabelece sua infecção usualmente nos pulmões (Ducati *et al.*, 2006), embora outros órgãos também possam ser acometidos pela doença como ossos, rins, gânglios, meninges, entre outros (Golden and Vikram, 2005).

O *M. tuberculosis* pertencente à família Mycobacteriaceae, é um dos componentes do complexo *M. tuberculosis*, junto com outros membros: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*. Todos os membros desse complexo são bactérias de multiplicação lenta com um tempo de geração perto de 24 horas e levam de 3 a 4 semanas para formar colônias em meios de cultura sólidos (Cole, 2002). O genoma da cepa H37Rv de *M. tuberculosis* tem 4.411.529 pares de bases (pb) e um conteúdo G+C de 65,6% (Cole *et al.*, 1998).

Essa bactéria tem forma de bastonete, não tem flagelo nem forma esporos, não produz toxinas nem tem cápsula. Os bacilos têm largura e altura variando de 0,3-0,6 e 1-4 μm , respectivamente, e possuem um complexo envelope celular (Ducati *et al.*, 2006). Sua parede tem baixa permeabilidade, já que possui uma estrutura e composição rica em lipídeos (De Rossi *et al.*, 2006).

O *M. tuberculosis* tem a capacidade de entrar em períodos de latência com uma atividade metabólica limitada, dificultando a ação dos antimicrobianos, contribuindo para a natureza crônica da doença e impondo um regime de tratamento longo. Além disso, existem, numa mesma infecção, populações de bacilos de comportamentos diferentes em função de sua localização e atividade. Assim, os bacilos presentes nas cavidades pulmonares multiplicam-se de forma ativa em um ambiente aeróbio, os bacilos do interior dos macrófagos, o fazem em um ambiente microaerofílico, que induz a latência, e os bacilos que se encontram no interior da lesão caseosa tem, ocasionalmente, um ciclo replicativo. Por outro lado, se o *M. tuberculosis* pode multiplicar-se nos tecidos, onde a penetração dos antibióticos é facilitada, no material caseoso a penetração dos antibióticos é mais difícil. Os fármacos antituberculosos apresentam um perfil de atividade diferenciado

frente a cada uma dessas localizações e populações, e é necessário assegurar-se de que o tratamento prescrito seja ativo contra todas elas (Coll, 2003).

O estado de dormência, no qual o bacilo permanece quiescente, pode ser resultado da ação de mediadores celulares da resposta imune que podem conter, mas não erradicar a infecção. Quando a imunidade diminui, as bactérias dormentes reativam-se, causando a deflagração da doença, mesmo décadas após a infecção inicial (Cole *et al.*, 1998).

Transmissão e sintomas

A principal via de transmissão e infecção ocorre de pessoa a pessoa, através de pacientes com TB ativa que tosse como resultado da inflamação pulmonar crônica típica. As partículas liberadas por um paciente doente são exaladas de um pulmão infectado para o ar, sendo capazes de ficar em suspensão por horas, representando uma doença altamente contagiosa (Ducati *et al.*, 2006). Os principais determinantes do risco de infecção são a concentração de bacilos da partícula exalada pela fonte, suas características aerodinâmicas, a taxa de ventilação e o tempo de exposição (Bloom and Murray, 1992).

A doença cavitária, onde existe uma lesão necrótica granulomatosa que causa erosão dos brônquios, expelindo milhões de bactérias nas vias aéreas, é fortemente associada com aumento da transmissão (Flynn and Chan, 2005).

Quando infectado com *M. tuberculosis*, a maioria dos indivíduos desenvolve infecção latente e assintomática. Esse enorme reservatório representa a principal fonte de casos novos, pois uma pessoa infectada latentemente tem a chance de 5-10% de desenvolver tuberculose durante toda a sua vida, mas se ela estiver infectada com o vírus HIV essa proporção passa para 5-10% por ano de vida. O HIV nesse caso é um fator ambiental que afeta a taxa de manifestação da doença (Ottenhoff, 2009).

Outros fatores que podem afetar a conversão de infecção latente para doença formam uma rede complexa de interações patógeno-hospedeiro: o status do hospedeiro (genética, nutrição, vacinação, estado de saúde), fatores ambientais (influências imunomoduladoras como co-infecções) e a virulência da cepa de *M. tuberculosis* (Ottenhoff, 2009).

O processo patológico e inflamatório produz sintomas típicos da TB, como fraqueza, febre, perda de peso, suores noturnos, dores no peito, insuficiência respiratória e tosse (Bloom and Murray, 1992).

Tratamento

A TB é uma doença curável em praticamente 100% dos casos novos, sensíveis aos medicamentos anti-TB, desde que obedecidos os princípios básicos da terapia medicamentosa e a adequada operacionalização do tratamento. O tratamento dos bacilíferos é a atividade prioritária de controle da TB, uma vez que permite interromper a cadeia de transmissão. A transmissibilidade está presente desde os primeiros sintomas respiratórios, caindo rapidamente após o início do tratamento efetivo. Na prática, quando o paciente não tem história de tratamento anterior nem outros riscos conhecidos para a resistência, pode-se considerar que, após 15 dias de tratamento e havendo melhora clínica, o paciente já é não infectante (BRASIL, 2010).

Em 1979, o Brasil preconizou o tratamento para a TB composto pelo Esquema I com duração de seis meses e consistindo de duas fases. A primeira é a fase intensiva que dura dois meses, com três drogas (INH, RIF e PZA) ministradas diariamente. Durante a fase de continuação (quatro meses), INH, RIF também são administradas diariamente. A duração do tratamento aumenta para nove meses quando a PZA não é empregada durante a fase intensiva. O EMB e STR são utilizados para tratamento de pacientes com intolerância para um dos outros fármacos ou infectados por cepas resistentes (BRASIL, 2002). Os esquemas de tratamento adotados no Brasil desde 1979 estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Esquemas de tratamento da TB utilizados no Brasil desde 1979.

Esquemas de Tratamento da TB		
Sem tratamento anterior, casos novos de todas as formas exceto meningoencefalite	Esquema 1	2 meses: RIF / INH / PZA 4 meses: RIF / INH
Com tratamento anterior, casos de retratamento em recidivas ou retorno após abandono do esquema 1	Esquema 1 Reforçado	2 meses: RIF / INH / PZA 4 meses: RIF / INH / EMB
Meningoencefalite tuberculosa		2 meses: RIF / INH / PZA
Casos de meningite tuberculosa	Esquema 2	7 meses: RIF / INH
Falência do esquema 1 ou esquema 1 reforçado e casos de falência do 1, 1R ou 2	Esquema 3	3 meses: STR / ETH / PZA 9 meses: ETH / EMB

ETH, etionamida; EMB, etambutol; STR, estreptomicina; PZA, pirazinamida; RIF, rifampicina; INH, isoniazida. Adaptado de Brasil, 2002

Em 2009, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, juntamente com o seu Comitê Técnico Assessor reviu o sistema de tratamento da TB no Brasil e introduziu o EMB como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do Esquema básico (antigo esquema 1). O novo esquema de tratamento utilizado no Brasil encontra-se na tabela 2. Essa recomendação e apresentação farmacológica são as preconizadas pela OMS e utilizadas na maioria dos países (BRASIL, 2010).

Tabela 2. Esquemas terapêuticos básicos utilizados atualmente no Brasil.

Esquema terapêutico	
	2 meses: RIF / INH / PZA/ EMB
Esquema Básico adultos	4 meses: RIF / INH
	2 meses: RIF / INH / PZA
Esquema Básico Crianças	4 meses: RIF / INH
	2 meses: RIF / INH / PZA/ EMB
Esquema Tuberculose Meningoencefálica	7 meses: RIF / INH

EMB, etambutol; PZA, pirazinamida; RIF, rifampicina; INH, isoniazida. Adaptado de BRASIL, 2010.

Resistência aos fármacos

Embora a TB seja uma doença curável, o tratamento de seis meses necessário para curar a doença é bastante longo e ainda apresenta significativo risco de toxicidade e efeitos adversos. Esses fatores fazem com que a adesão do paciente ao tratamento seja difícil, e essa não-adesão, frequentemente, seleciona bactérias resistentes às drogas anti-TB (Zhang, 2005). A prescrição errônea por parte do médico e o uso em monoterapia, seja por suplemento irregular dos antimicrobianos ou outro motivo, também podem selecionar cepas resistentes (Zhang and Yew, 2009).

O *M. tuberculosis* é naturalmente resistente a muitos antibióticos devido, principalmente, ao envelope altamente hidrofóbico, que atua como uma barreira para muitos compostos. Vários determinantes do potencial de resistência são também codificados pelo genoma. Isso inclui enzimas hidrolíticas ou modificadoras de drogas como as β - lactamases e acetil-aminoglicosideo-transferases e bombas de efluxo de drogas (Cole *et al.*, 1998).

Para bactérias em geral, a resistência adquirida pode ser devido a mutações (mutações pontuais, deleções, inserções, inversões) ou por transferência genética horizontal. Em *M. tuberculosis* ainda não foi descrito nenhum elemento genético móvel, como os plamídeos e transposons conferindo resistência (Zhang and Yew, 2009). Por isso, o desenvolvimento da resistência neste microrganismo depende basicamente de alterações genéticas no genoma da bactéria (Normark and Normark, 2002).

A resistência do *M. tuberculosis* às drogas anti-TB é consequência de mutações espontâneas nos genes que codificam o alvo do antimicrobiano ou enzimas envolvidas na sua ativação. As mutações associadas à resistência já foram descritas para vários compostos e a resistência a múltiplos antimicrobianos é desenvolvida devido à aquisição sequencial de mutações em diferentes genes, também usualmente selecionadas por um tratamento inadequado (Normark and Normark, 2002; Saunders *et al.*, 2011). Essas mutações encontradas em isolados resistentes a mais de um antimicrobiano não diferem das encontradas em isolados mono resistentes.

As drogas anti-TB podem ser categorizadas em antimicrobianos de primeira (mais eficientes e menos tóxicos) e segunda linha. Os de primeira linha são: INH, RIF, PZA, EMB e STR; e os de segunda linha: KAN, AMK, CAP, cicloserina, PAS, etionamida e fluoroquinolonas (Zhang, 2005).

As cepas resistentes a mais de um antimicrobiano podem ser classificadas em duas categorias, de acordo com os antimicrobianos para os quais essas cepas são resistentes: multidroga resistente (MDR) e extensivamente-resistente às drogas (XDR).

Uma cepa é considerada MDR quando apresenta resistência aos antimicrobianos de primeira-linha RIF e INH, que fazem parte de ambas as fases do esquema básico e são as duas drogas mais importantes do tratamento. A resistência a ambos obriga que sejam utilizados no tratamento outros antimicrobianos de menor efetividade, maior toxicidade e maior custo (De la Iglesia and Morbidoni, 2006).

Mais recentemente, cepas XDR tem surgido com resistência a RIF e INH mais a resistência adicional a derivados de fluoroquinolona e pelo menos uma das drogas injetáveis de segunda linha (amikacina (AMK), kanamicina (KAN) e/ou capreomicina (CAP) (Ottenhoff, 2009).

Alguns dos antimicrobianos de importância para essa tese serão descritos com mais detalhes a seguir.

Rifampicina

A RIF interfere na síntese do ácido ribonucléico (RNA), pois se liga na subunidade β da RNA polimerase (codificada pelo gene *rpoB*) (Telenti *et al.*, 1993). As mutações ocorrem em uma região bem definida de 81 pb desse gene, onde são encontradas 96% das mutações nos isolados resistentes a RIF (Telenti *et al.*, 1997). As mutações nas posições 531 e 526 estão entre as mutações mais frequentes entre os isolados resistentes e estão, frequentemente, relacionadas com alto nível de resistência (Zhang and Yew, 2009; Almeida da Silva and Palomino, 2011).

Isoniazida

O mecanismo de ação da INH ainda não está totalmente elucidado. A INH é uma pró-droga que requer a ativação pela enzima catalase-peroxidase (codificada pelo gene *katG*) da bactéria para gerar vários radicais reativos (Vilchèze and Jacobs, 2007; Almeida da Silva and Palomino, 2011). O alvo mais conhecido da INH é a via de síntese do ácido micólico da parede celular, especialmente a proteína carregadora enoil-acil redutase envolvida nessa síntese e codificada pelo gene *inhA* (Banerjee *et al.*, 1994; Vilchèze and Jacobs, 2007), embora as espécies reativas produzidas durante a ativação da INH possam causar danos também ao ácido desoxirribonucléico (DNA), carboidratos, lipídeos e inibir o metabolismo da nicotimida adenina dinucleotídeo (NAD) (Zhang, 2005).

O mecanismo de ação da INH ainda pode envolver outros genes ainda desconhecidos, já que existem isolados clínicos resistentes a este antimicrobiano que não apresentam mutações em *katG* e nem em *inhA*. Outro gene relacionado com a resistência a INH (*ndh*), codifica uma enzima: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) desidrogenase (De la Iglesia and Morbidoni, 2006).

A substituição de um único nucleotídeo no códon 315 (AGC→ACC; S315T) do gene *katG* pode ser encontrada em 53%-96% dos isolados resistentes a INH e é a mutação mais encontrada em isolados resistentes a este antimicrobiano (Marttila *et al.*, 1998, van Soolingen *et al.*, 2000).

Estreptomicina

A STR é um aminoglicosídeo e atua interferindo na síntese protéica, pois inibe a iniciação da tradução do RNA mensageiro (mRNA), facilitando uma leitura errônea do código genético (Honoré and Cole, 1994; Zhang, 2005). O local de sua ação na síntese protéica é na subunidade ribossomal 30S, especificamente na proteína ribossomal S12 (codificada pelo gene *rpsL*) e no RNA ribossomal (rRNA) 16S (codificado pelo gene *rrs*) (Finken *et al.*, 1993).

Mutações nesses dois genes são os principais mecanismos de resistência em alto nível à STR. A mutação mais comumente encontrada é a substituição no códon 43 do gene *rpsL* (AAG→AGG; K43R), porém mutações no códon 88 (AAG→CAG; K88Q; AAG→AGG; K88R) também são bastante comuns (Fukuda *et al.*, 1999; Brzostek *et al.*, 2004; Méier *et al.*, 1996). As mutações no gene *rrs* ocorrem nas regiões por volta dos nucleotídeos 530 e 912 (Finken *et al.*, 1993; Sreevatsan *et al.*, 1997). Entretanto, esses dois genes juntos explicam apenas 70% dos casos de resistência fenotípica (Sreevatsan *et al.*, 1997; Riska *et al.*, 2000) e, por esse motivo, outro locus ou mecanismo deve estar envolvido nessa resistência.

Recentemente, foi observado que mutações no gene *gidB*, que codifica uma 7-metilguanosina metiltransferase específica para o 16S rRNA, estão associadas com a resistência em baixo nível a STR em *M. tuberculosis*. As mutações nesse gene têm sido observadas em alta frequência em isolados clínicos de *M. tuberculosis* (Okamoto *et al.*, 2007, Spies *et al.*, 2008).

Kanamicina e Capreomicina

As drogas injetáveis como a KAN e CAP são as principais drogas de segunda linha para o tratamento da tuberculose MDR (Jugheli *et al.*, 2009).

A KAN é um aminoglicosídeo e, assim como a STR, é inibidora da síntese protéica através de modificações das estruturas ribossomais no rRNA 16S (Zhang, 2005).

A CAP é um antibiótico polipeptídico obtido do *Streptomyces capreolus*, sua estrutura química é diferente dos aminoglicosídeos, entretanto, eles são similares em termos da sua ação e efeitos adversos. O mecanismo de ação da CAP ainda não está completamente esclarecido. Acredita-se que a droga é ativa, pois interfere na síntese protéica bacteriana (Arbex *et al.*, 2010).

Mutações no gene que codifica o rRNA 16S (*rrs*) particularmente nas posições 1401, 1402, 1484, têm sido associadas com a resistência a esses antimicrobianos (Feuerriegel *et al.*, 2009; Almeida da Silva and Palomino, 2011). Tem sido sugerido que mutações no gene *tlyA* (codifica uma rRNA metiltransferase que modifica os nucleotídeos C1409 na hélice 44 do rRNA 16S e o nucleotídeo C1920 na hélice 69 do rRNA 23S) são responsáveis pela resistência a CAP. Tem sido reportada resistência cruzada variada entre vários aminoglicosídeos e CAP (Jugheli *et al.*, 2009). Um estudo recente encontrou que mutações na região promotora do gene *eis* em *M. tuberculosis* confere baixo nível de resistência a KAN (Almeida da Silva and Palomino, 2011).

Ofloxacina

As fluoroquinolonas (FQ) são potentes drogas de segunda linha recomendadas para tratar a tuberculose MDR, a ofloxacina (OFL) é uma delas. O alvo principal das FQ é a DNA girase, uma topoisomerase do tipo II composta por duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. Na célula, as topoisomerases regulam o superenrolamento das fitas de DNA para atender as necessidades da transcrição e replicação. Mutações nas regiões que determinam a resistência às quinolonas (QRDR) desses genes é o mecanismo primário de desenvolvimento da resistência as FQ (Mokrousov *et al.*, 2008).

As mutações em QRDR *gyrA* tem sido identificadas em uma alta proporção de cepas resistentes a OFL e mutações em *gyrB* são encontradas em menor mas não negligenciável número de isolados resistentes a OFL (Mokrousov *et al.*, 2008; Feuerriegel *et al.*, 2009). A mutação mais encontrada em *gyrA* é no codon 94 (GAC→GGC; D94G) (Feuerriegel *et al.*, 2009) e a mutação no codon 95 é considerada um polimorfismo que não está envolvido com a resistência a FQ. Geralmente duas mutações em *gyrA* ou mutações concomitantes em *gyrA* e *gyrB* são necessárias para o desenvolvimento de um nível maior de resistência (Zhang and Yew, 2009).

Epidemiologia Molecular

A genotipagem de cepas de *M. tuberculosis* é utilizada para responder questões evolucionárias e para pesquisar a dinâmica de transmissão dessa doença em estudos epidemiológicos (Bouakaze *et al.*, 2010). A tipagem molecular ainda pode ser utilizada

para aumentar o conhecimento sobre as diferenças na virulência e transmissão e a variação da efetividade das vacinas (Comas *et al.*, 2009).

As técnicas mais utilizadas para diferenciar as cepas de *M. tuberculosis* utilizam técnicas baseadas no polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) da sequência de inserção IS6110, *spoligotyping* e unidade de repetição de micobactéria- repetição em tandem de número variável (MIRU-VNTR, *mycobacterial interspersed repetitive units- variable number of tandem repeats*)(Gagneux and Small, 2007).

Spoligotyping é uma técnica de genotipagem que explora a variabilidade da região de repetição direta (DR) em *M. tuberculosis* (Kamerbeek *et al.*, 1997). Desde 1999, uma base de dados da diversidade genética tem sido organizada para analisar a diversidade genética do locus DR na população e estudar a complexidade da transmissão global levando em conta a evolução temporal e espacial da TB (Brudey *et al.*, 2006). Os dados acumulados revelam que poucas linhagens principais estão distribuídas em todo o mundo, enquanto outras são específicas de determinadas regiões geográficas, figura 2 (Brudey *et al.*, 2006; Sola *et al.*, 2001). Hoje em dia, a base de dados (SpolDB4) se tornou acessível via internet,

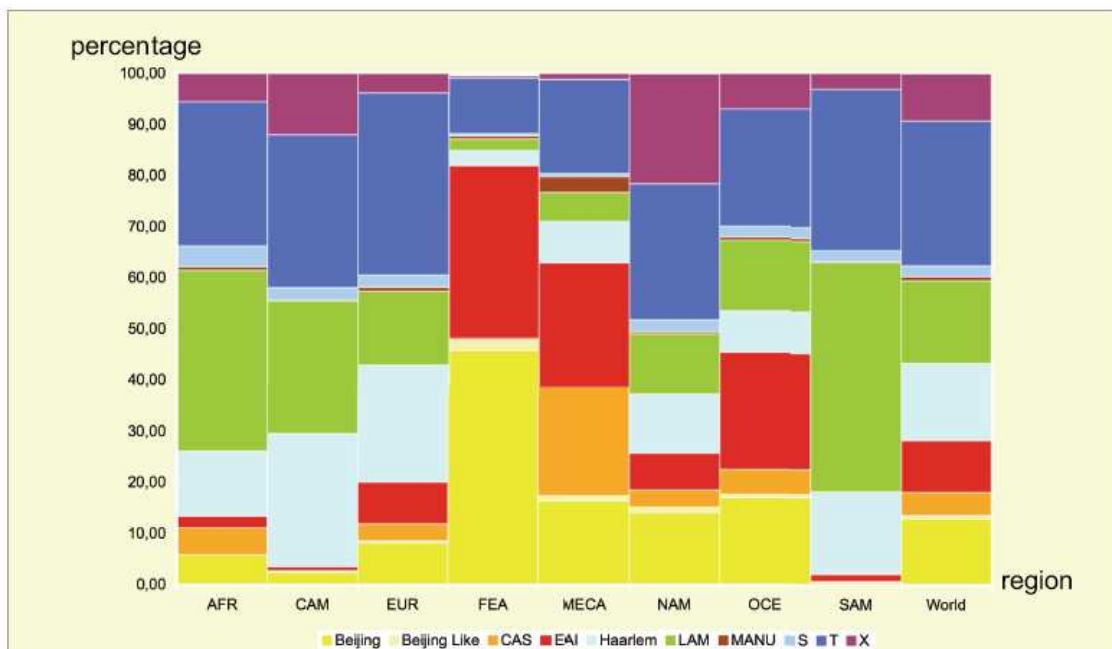


Figura 2. Percentagem das principais linhagens do SpolDB4 (Beijing, Beijing-like, CAS, EAI, Haarlem, LAM, Manu, X, T, S). AFR, África; CAM, America Central; EUR, Europa; FEA, Extremo-oriente Asiático; MECA, Meio-orient e Centro-Asiático; NAM, América do Norte; OCE, Oceania; SAM, América do Sul (Brudey *et al.*, 2006).

o que facilitou a comparação de estudos epidemiológicos em uma escala global. Na última atualização feita em 2006, foram descritos 1939 tipos diferentes de um total de 39.295 cepas representantes de 122 países (Brudey *et al.*, 2006).

O RFLP da IS6110 é considerado o padrão-ouro entre as técnicas de genotipagem de *M. tuberculosis* (van Soolingen *et al.*, 2007). A IS6110 é um transposon exclusivo do complexo *M. tuberculosis* e pode ser encontrado em uma grande variedade de número de cópias e posição no genoma. Esta técnica é demorada e trabalhosa, requer semanas de incubação para cultivar um número de organismos que possa fornecer quantidade de DNA suficiente para sua realização (Mathema *et al.*, 2006; van Soolingen *et al.*, 2007). Além disso, os padrões obtidos são difíceis de comparar entre laboratórios distintos, pois requerem programas especializados para análise dos complexos padrões de bandas gerados (Mathema *et al.*, 2006). As cepas que possuem um número pequeno de cópias de IS6110, geralmente inferior a 6, podem apresentar padrões idênticos, mesmo não sendo epidemiologicamente relacionadas (Goulding *et al.*, 2000). Isto ocorre devido à existência de pontos preferenciais de integração do IS6110 no genoma de *M. tuberculosis* (Filliol *et al.*, 2000).

O método de MIRU-VNTR baseia-se na amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de múltiplos loci utilizando *primers* específicos para as regiões flangeadoras desses loci e na determinação dos tamanhos dos amplicons, que refletem o número de cópias dos MIRU-VNTR alvo. A análise dos tamanhos pode ser realizada utilizando um sistema de eletroforese capilar (Allix *et al.*, 2004), eletroforese em gel (Mazars *et al.*, 2001) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Evans *et al.*, 2004). Os dados digitalizados permitem comparação inter e intralaboratorial.

As técnicas descritas brevemente acima são baseadas em elementos genéticos móveis (IS6110) ou elementos repetitivos do DNA (*spoligotyping* e MIRU-VNTR) que mudam rapidamente, resultando em um alto poder discriminatório, um importante pré-requisito para ferramentas moleculares serem usadas para determinar transmissão, identificando também contaminação cruzada nos laboratórios e diferenciando reativação de reinfeção da doença em pacientes (Gagneux and Small, 2007). Entretanto, devido à rápida mudança desses loci, padrões idênticos podem surgir em linhagens de cepas não relacionadas (homoplasia) como resultado da evolução convergente (Warren *et al.*, 2002; Gutacker *et al.*, 2006). Assim como estudos em outros organismos já salientaram, são

necessários diferentes marcadores para o estudo de diferentes escalas evolucionárias (Gagneux and Small, 2007).

Para que associações filogenéticas sejam definidas sem ambiguidade, marcadores genéticos precisam ser únicos e idealmente irreversíveis. Esses marcadores genéticos têm sido identificados em *M. tuberculosis* na forma de polimorfismos de sequências grandes (LSP, *large sequence polymorphisms*) e polimorfismos de único nucleotídeo (SNP, *single nucleotide polymorphisms*). Os SNPs atuam como mutações filogeneticamente informativas, pois a baixa variação nas sequências de DNA de *M. tuberculosis* torna a ocorrência de mutações independentes muito improváveis, juntamente com a falta de transmissão horizontal de genes que reduz ainda mais a probabilidade de observação de SNPs independentes e recorrentes. Então, SNPs e LSPs são filogeneticamente informativos em *M. tuberculosis*, tornando-se marcadores ideais para inferir sobre filogenias mais profundas (Gagneux and Small, 2007).

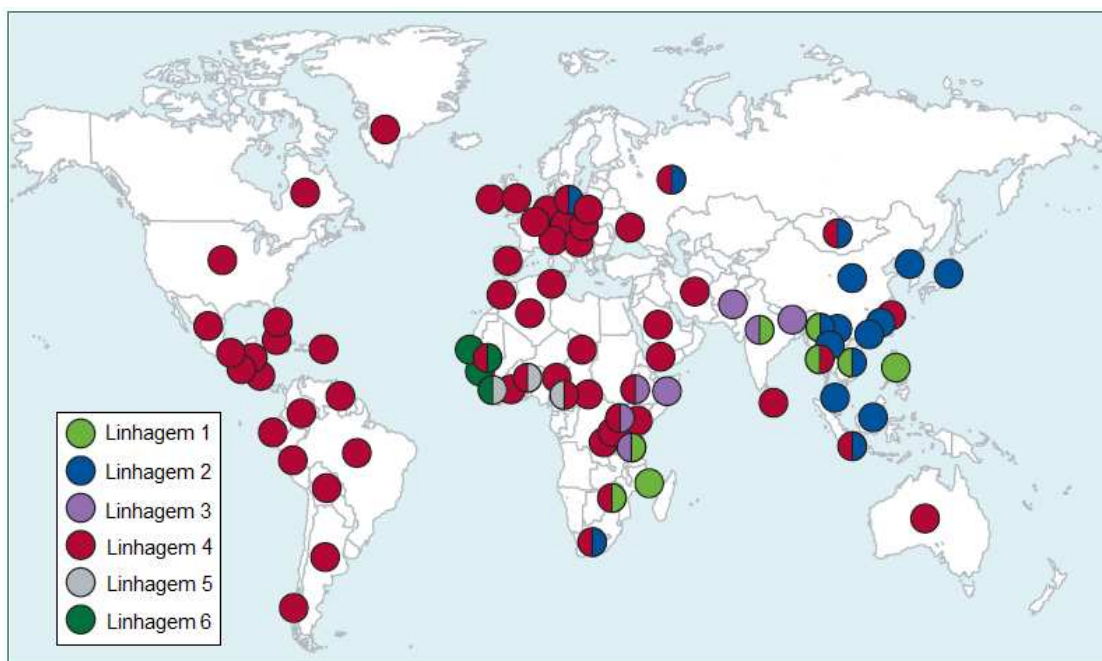


Figura 3. Filogeografia global de *M. tuberculosis* de acordo com os LSPs. Os círculos coloridos indicam a linhagem predominante. Adaptado de Gagneux and Small, 2007.

Um estudo incluindo pacientes tratados de TB em São Francisco (Estados Unidos da América), mas nascidos e infectados com a doença em 80 diferentes países que foram analisados através de 19 LSPs filogeneticamente informativos e linhagem específicos,

revelou que existem 6 linhagens principais e 15 sublinhagens de *M. tuberculosis*, e constatou que a genética da população de *M. tuberculosis* é altamente estruturada geograficamente. Cada uma das seis linhagens principais foi associada com uma área geográfica em particular e o nome dado a linhagem reflete a sua associação geográfica, figura 3 (Gagneux *et al.*, 2006b).

Os achados desse estudo são consistentes com o cenário da origem e evolução da TB humana, onde *M. tuberculosis* expandiu e se diversificou quando se espalhou para fora do Leste da África. E, como consequência, diferentes linhagens de *M. tuberculosis* podem ter se adaptado a populações humanas específicas (Gagneux *et al.*, 2006b). Essas linhagens podem ter moldado e selecionado diferentes polimorfismos genéticos associados à resistência do hospedeiro nessas diferentes populações humanas (Ottenhoff, 2009).

Existe uma nomenclatura confusa entre os métodos de genotipagem, onde os grupos genéticos recebem diferentes nomes baseados na localização geográfica, a tabela 3 mostra a comparação entre a nomenclatura usada pelas técnicas de LSP e *spoligotyping*.

Tabela 3. Comparação da nomenclatura dos genótipos usando LSP e *spoligotyping*.

LSP (Gagneux, 2006)	<i>Spoligotyping</i> (Filliol <i>et al.</i> , 2003)	região prevalente
Indo-Oceania	África-Índia Ocidental (EAI)	Sul da Ásia Ocidental, África Ocidental e Sul da Índia
Ásia Oriental	W-Beijing	China, Japão, Sul da Ásia Ocidental, Rússia
Índia-Africa Oriental	Ásia Central (CAS)	Norte da Índia, Paquistão, Líbia, Sudão
Euro-America	X, Haarlem, Latino America e Mediterrâneo (LAM)	Ubíquo
África Ocidental 1	<i>M. africanum</i>	Nigéria, Gana
África Ocidental 2	<i>M. africanum</i>	Senegal, Gambia

Atualmente, SNPs vem sendo usados em estudos filogenéticos para diferenciar as linhagens de *M. tuberculosis* (Bouakaze *et al.*, 2010; Filliol *et al.*, 2006; Gutacker *et al.*,

2006). Alguns SNPs têm sido relacionados com linhagens específicas de *M. tuberculosis* em diferentes estudos: como o SNP no gene *mgtC* (R182H) pode diferenciar as cepas entre as linhagens Haarlem e não-Haarlem (Alix *et al.*, 2006); a variação em Rv2629 (N64A) foi encontrada exclusivamente em isolados pertencentes a linhagem Beijing (Chakravorty *et al.*, 2008; Homolka *et al.*, 2009); um SNP em *fadD28* no codon 507 pode ser um marcador específico para isolados pertencentes a linhagem *East Asia* (Ásia oriental) (Chuang *et al.*, 2010), e um SNP no codon 103 do gene que codifica Ag85C (Rv0129c) foi descrito como sendo LAM linhagem específico (Gibson *et al.*, 2008).

Fitness

O progresso da evolução é determinado pelo aumento do *fitness* do organismo. O conceito de *fitness* é derivado de disciplinas como ecologia e biologia evolutiva e implica na existência de uma variação que pode ser herdada entre indivíduos da mesma espécie. Para agentes infecciosos, *fitness* é composto da medida da habilidade de um organismo sobreviver, reproduzir e ser transmitido (Cohen *et al.*, 2003). Este é um conceito inclusive numérico, onde, o *fitness* do isolado sensível pode ser definido como tendo valor igual a 1 (Gagneux *et al.*, 2006c).

A evolução adaptativa opera sobre a substituição dos genes loci específicos que codificam um fenótipo sob seleção. Como consequência de uma mudança no ambiente, um alelo previamente favorecido A_1 , será substituído pelo agora favorecido alelo nesse locus, A_2 . Se as condições do ambiente estiverem constantes em uma população, o genótipo mutante mais adaptado nesse ambiente prevalecerá e quando mutantes mais adaptados estejam sendo gerados, um substituirá o outro (Levin *et al.*, 2000).

Nas bactérias, as mutações que conferem resistência aos fármacos ocorrem nos genes que codificam os alvos celulares desses fármacos. Esses alvos geralmente são codificados por genes essenciais e altamente conservados, logo, esses mutantes podem possuir enzimas que não exercem as atividades funcionais tão eficientemente quanto os isolados selvagens ou não mutados (Borrel and Gagneux, 2009). Geralmente é assumido que isolados resistentes às drogas possuem um custo biológico (diminuição do *fitness*) em decorrência da aquisição da resistência (Billington *et al.*, 1999). Entretanto, mutações que conferem resistência às drogas podem ter impactos diferentes no *fitness* bacteriano, que

pode variar com a mutação específica que causa a resistência e também com o *background* genético da bactéria (Gagneux, 2009).

Na ausência do fármaco, essas mutações são associadas com uma diminuição nas taxas de replicação da bactéria, pois podem causar lesões em processos vitais (*e.g.* na transcrição para resistência à RIF, na síntese protéica para resistência à STR). Na falta da pressão seletiva do antibiótico, essa redução na replicação, frequentemente, constitui uma desvantagem seletiva para o mutante resistente (Reynolds, 2000).

A perda do *fitness* pode se refletir, na ausência dos antibióticos, não só em uma taxa de crescimento reduzida *in vivo* ou *in vitro*, mas também como uma taxa de transmissão reduzida, um aumento na taxa de remoção do patógeno pelo sistema imune ou uma diminuição da invasão ao hospedeiro. Os custos da resistência estão entre os fatores mais importantes que determinam ambos, a taxa e a amplitude da emergência da resistência (Schulz zur Wiesch *et al.*, 2010).

Isolados de *Escherichia coli* foram descritos como tendo uma taxa de crescimento menor depois da aquisição de plasmídios conferindo resistência (Kyslik *et al.*, 1993). Schrag e Perrot (1996) observaram que o alelo Str^s (sensível à STR) tem uma vantagem sobre o alelo Str^r (resistente à STR), e o *fitness* associado com essa resistência é estimado em 14% e 19% por geração, em experimentos de competição entre o alelo selvagem e o mutante resistente. Outros estudos também mostram a diminuição do *fitness* pelo isolado mutante. Davies *et al.* (2000) demonstraram que o isolado multidroga resistente de *M. tuberculosis* tinha um *fitness* relativo de 0,73.

Embora a aquisição de determinantes de resistência aos antimicrobianos é frequentemente associada com diminuição do *fitness*, as mutações chamadas de sem custo biológico ou com baixo custo têm sido descritas em vários sistemas biológicos. Embora cepas resistentes às drogas frequentemente sofram uma redução inicial no *fitness*, elas continuam evoluindo através da aquisição de uma ou mais mutações em sítios secundários que podem melhorar ou até restaurar o *fitness* dessas cepas através do tempo. Esse processo é conhecido como evolução compensatória (Borrel and Gagneux, 2009). Tanto na presença como na ausência da pressão seletiva dos antibióticos, mutações compensatórias podem ser obtidas sem a perda da resistência (Schrag and Perrot, 1996; Schrag *et al.*, 1997).

Adaptações que aumentam o *fitness* em *E.coli* com alterações na RNA polimerase (resistente a RIF) ocorrem mais por mutações compensatórias do que pela reversão para um estado novamente sensível, tanto na presença quanto na ausência de antibióticos (Reynolds, 2000).

Os custos da resistência são geralmente medidos relativamente com o seu correspondente selvagem na ausência de antibióticos, similar ao que ocorre no organismo do hospedeiro quando a bactéria mutante resistente tem que competir com a população de bactérias sensíveis. Em muitos estudos o *fitness* da cepa resistente é medido em competição com a bactéria selvagem e na ausência de tratamento (Schulz zur Wiesch *et al.*, 2010). Algumas outras características que definem o *fitness* podem ser quantificadas em laboratório, embora a contribuição precisa para o sucesso empírico de um indivíduo no “mundo real” ainda não esteja clara. As abordagens utilizadas em laboratórios para estudo do *fitness* em *M. tuberculosis* resistente aos antimicrobianos incluem a medição de taxas de crescimento, infectividade em modelos animais e a capacidade de resistir a desafios específicos (Cohen *et al.*, 2003). Outra maneira de medir o *fitness* de um organismo transmissível é considerar a sua eficácia em gerar uma epidemia. O potencial epidêmico pode ser quantificado pela estimativa do número médio de infecções ou casos secundários causado por um genótipo específico depois da sua introdução em uma população. Não existe um método de medição do *fitness* que seja considerado padrão (Cohen *et al.*, 2003).

Vários estudos têm utilizado abordagens experimentais para estudar os efeitos da resistência às drogas no *fitness* de *M. tuberculosis*.

Para estudar a influência de diferentes mutações que conferem resistência a RIF no *fitness* de *M. tuberculosis*, Gagneux *et al.* (2006c) selecionaram mutantes espontâneos para o gene *rpoB* e através de experimentos de competição *in vitro* mostraram que todos os isolados resistentes a RIF tem um custo biológico (0,58 – 0,91). Quando a comparação foi feita entre isolados clínicos foi encontrado que quatro de cinco cepas clínicas com mutação em *rpoB* S531L não tinham qualquer perda de *fitness*. É importante destacar que *rpoB* S531L é a mutação associada com o menor custo biológico em mutantes de laboratório e com nenhuma perda de *fitness* em algumas cepas clínicas e que também é a mutação mais frequente relacionada com a resistência a RIF entre isolados clínicos globalmente. Em contraste, o isolado mutado R529Q em *rpoB*, possui o maior custo biológico de todos os mutantes gerados *in vitro* e nunca foi observado em isolados clínicos (Gagneux, 2009).

Ao gerar mutantes espontâneos de *M. tuberculosis* resistentes a RIF, Billington *et al.* (1999) obtiveram um número limitado de mutações no gene *rpoB* e perceberam que as mutações ocorriam em uma frequência similar. Os dados sugeriam que as mutações geradas são igualmente prováveis de acontecer (códon 531 e 526), mas a sua prevalência na população irá depender da habilidade do isolado que a possui de sobreviver, ou melhor, do custo biológico da mutação.

Mariam *et al.* (2004) compararam o *fitness* de uma cepa parental altamente virulenta e transmissível de *M. tuberculosis* com isolados espontaneamente gerados e resistentes a RIF. Todas as mutações geradas apresentaram um custo biológico, e é importante destacar aqui que a mutação específica S531W em *rpoB* é raramente encontrada em isolados clínicos de pacientes, embora associada com alto nível de resistência, conferiu o mais alto custo biológico.

Em um estudo sobre a resistência a INH, foi investigado o papel de diferentes mutações que conferem resistência a essa droga na transmissão de *M. tuberculosis* (Gagneux *et al.*, 2006a). Foi concluído que somente cepas com a mutação S315T em *katG* ou mutações fora desse gene conseguiram causar casos secundários. Esse resultado salienta que mutações distintas que conferem resistência às drogas podem ter efeitos variáveis no *fitness* da cepa e na sua transmissão (Gagneux, 2009).

Em outro estudo com esse mesmo antimicrobiano, foi demonstrado que a perda completa da atividade de KatG em cepas clinicamente resistentes a INH é associada com significativa diminuição do *fitness* e que mutações compensatórias no gene *ahpC* irão ocorrer com o tempo, a fim de restaurar o *fitness* dessas cepas (Bottger and Springer, 2008).

A mutação mais encontrada em cepas clínicas no gene *katG*, S315T, parece não ter mais a capacidade de ativar a INH enquanto mantém a atividade de catalase. Essa mutação é selecionada favoravelmente *in vivo*, pois ela causa resistência a INH, enquanto gera somente uma redução mínima do *fitness*. Neste estudo em particular, foi demonstrado ser virulenta em modelo animal da doença, indicando que uma perda significativa no *fitness* bacteriano parece não acontecer quando a cepa apresenta essa mutação (Pym *et al.*, 2002).

Quando isolados resistentes a STR foram estudados, foi demonstrado que 89 dos 90 isolados de *M. tuberculosis* mutados no códon 43 de *rpsL* tinham a mutação AAG→AGG, que é uma mutação classificada como sendo não-restritiva (apresenta propriedades

virulentas inalteradas determinadas experimentalmente *in vivo*) enquanto que *in vitro* esse tipo de mutação ocorre quase na mesma frequência que mutações restritivas (apresentam virulência atenuada) (Böttger *et al.*, 1998).

Foi avaliado se uma mutação em *rpsL* poderia estar associada com custo biológico em laboratório. Para isso foram feitos 10.000 repiques seriais em meio sem STR e com glicose limitada, utilizado um isolado de *E. coli*. Após, foi feito também o sequenciamento de DNA e foi comprovado que a sequência do gene *rpsL* do ancestral e do isolado depois de 10.000 gerações eram iguais (mutação no códon 42 lys-thr) (Schrag *et al.*, 1997).

A ocorrência de mutações sem custo biológico e a evolução compensatória de bactérias resistentes às drogas fez com que isolados resistentes não desaparecessem como um resultado do uso restrito de antibióticos, podendo, estes, persistir na população por um longo período, mesmo após o uso de antibióticos ser reduzido ou eliminado (Mariam *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm revelado que diferentes linhagens podem influenciar o *fitness* dos isolados de *M. tuberculosis*. Toungousova *et al.* (2004) estudaram o crescimento *in vitro* de cepas resistentes e não a RIF e observaram que algumas cepas resistentes a RIF do genótipo W-Beijing apresentam um crescimento reduzido em comparação as cepas sensíveis às drogas enquanto outras cepas resistentes a RIF cresciam tão bem quanto as sensíveis e as cepas sensíveis às drogas do genótipo não-Beijing foram as que apresentaram o menor custo biológico. Em um estudo com cepas brasileiras da linhagem LAM, foi descrito que as cepas com o genótipo LAM tinham uma taxa de crescimento mais rápido do que cepas não pertencentes a essa linhagem, não-LAM (von Groll *et al.*, 2010).

A TB-MDR é uma grande ameaça para a saúde humana em todo o mundo. Segundo Billington *et al.* (1999), que estudou o custo fisiológico da resistência à rifampicina induzida *in vitro* em *M. tuberculosis*, os isolados resistentes encontrados tinham somente uma modesta diminuição no *fitness* e, provavelmente, viveriam bem no ambiente.

Em suma, os resultados de estudos experimentais realizados com cepas resistentes a RIF, INH e STR sugerem que, em isolados clínicos, existe uma forte pressão seletiva que favorece mutações que conferem resistência às drogas e que causam o mínimo de custo biológico ou que diminuem pouco o *fitness* (Borrel and Gagneux, 2009).

Além de estudos experimentais, abordagens teóricas têm sido usadas para estudar as bactérias resistentes aos antimicrobianos. Evidências teóricas sugerem que o *fitness* dos isolados resistentes às drogas é um dos principais parâmetros que ditam o futuro das epidemias de tuberculose MDR e XDR (Borrel and Gagneux, 2009). Modelos matemáticos têm sido construídos para um melhor entendimento sobre a dinâmica de transmissão da TB, para uma previsão de futura epidemia de TB resistente às drogas e para o correto desenho de programas públicos de saúde (Luciani *et al.*, 2009; Cohen and Murray, 2004).

JUSTIFICATIVA

Os avanços científicos e tecnológicos ainda não foram capazes de erradicar ou mesmo controlar a TB, fazendo com que esta enfermidade permaneça como um importante problema de saúde pública no século XXI. Aliado ao quadro epidemiológico grave, o número de casos de TB causados por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplos antibióticos vem crescendo em todo o mundo, ameaçando não apenas o controle dessa doença como prenunciando um futuro ainda mais difícil.

Estratégias de controle como vacinas, métodos de diagnóstico e regimes de tratamento, precisam ser melhoradas, o que passa necessariamente pelo melhor conhecimento da biologia do bacilo e suas peculiaridades.

Alguns modelos matemáticos estimam que o futuro da epidemia de isolados resistentes às drogas será influenciado pelo custo biológico determinado pela resistência. A validação destas estimativas dependem de experimentos que avaliem no campo da biologia as idiosincrasias dos microrganismos. Entender a ecologia da resistência aos antimicrobianos é essencial para a elaboração de programas racionais visando preservar o tempo de vida efetivo dos fármacos.

Este estudo visa aprofundar o conhecimento sobre as diferentes mutações e genótipos que ocorrem em isolados clínicos brasileiros de *M. tuberculosis* e seus efeitos no *fitness* destas cepas.

OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi verificar se isolados com mutações nos genes *rpsL*, *rrs*, *gidB*, *rpoB* e *katG* apresentam alguma vantagem adaptativa quando comparados com isolados que apresentam mutações que ocorrem em menor frequência e com isolados sem mutações. Para que esse objetivo fosse alcançado foram selecionados 76 isolados resistentes à estreptomicina e/ou rifampicina pelo método das proporções e 30 isolados sensíveis a todas as drogas de primeira linha, pelo mesmo método, do período de 2005-2006 pertencentes ao banco de amostras do LACEN-RS (Laboratório Central do estado do Rio Grande do Sul).

A partir da seleção das amostras os objetivos específicos puderam ser alcançados. Foram eles: analisar as sequências dos genes *rpsL*, *rrs* e *gidB* dos isolados, genes esses relacionados com a resistência à estreptomicina; analisar a sequência da região *hot-spot* do gene relacionado com a resistência à rifampicina: *rpoB*; sequenciar o gene *katG* em alguns isolados selecionados e resistentes à isoniazida; analisar o nível de resistência às drogas de primeira linha: rifampicina, isoniazida e estreptomicina, segundo o método REMA; analisar o nível de resistência às drogas de segunda linha: ofloxacina, capreomicina, kanamicina nos isolados MDR, segundo o método REMA; comparar os genótipos dos isolados utilizando *spoligotyping* e PCR LAM específico. Esses foram os objetivos mais básicos, pois através desses resultados obtidos, determinados isolados foram escolhidos para participar das outras partes do estudo.

Os isolados que apresentaram as mutações de interesse e cultura viável foram utilizados nos estudos subsequentes, que visavam estudar o *fitness*, cumprindo os seguintes objetivos: analisar a velocidade de crescimento das cepas em placas e sistema MGIT960; comparar o *fitness* entre os isolados mutados e não mutados; comparar o *fitness* dos isolados de diferentes linhagens; realizar competições entre os isolados mais representativos.

REFERÊNCIAS

- Alix E, Godreuil S and Blanc-Potard AB (2006) Identification of a Haarlem genotype-specific single nucleotide polymorphism in the *mgtC* virulence gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44:2093-2098.
- Allix C, Supply P and Fauville-Dufaux M (2004) Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clin Infect Dis* 39:783-789.
- Almeida da Silva PE and Palomino JC (2011) Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother* May 9. [Epub ahead of print]
- Arbex MA, Varella MC, de Siqueira HR and de Mello FA (2010) Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: Second-line drugs. *J Bras Pneumol* 36:641-656.
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, Lisle G and Jacobs JR (1994) *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 263:227-230.
- Billington OJ, McHugh TD and Gillespie SH (1999) Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1866–1869.
- Bloom BR and Murray CJL (1992) Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257: 1055-1064.
- Borrel S and Gagneux S (2009) Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 13:1456–1466.
- Böttger EC, Springer B, Pletschette M and Sander P (1998) Fitness of antibiotic-resistant microorganisms and compensatory mutations. *Nat Med* 12:1343-1344.
- Böttger EC and Springer B (2008) Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. *Eur J Pediatr* 167:141–148.
- Bouakaze C, Keyser C, de Martino SJ, Sougakoff W, Veziris N, Dabernat H and Ludes B (2010) Identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex species by use of a SNaPshot minisequencing-based assay. *J Clin Microbiol* 48:1758-1766.
- BRASIL (2002) Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5^a edição. Rio de Janeiro, FUNASA/CRPHF/SNPT.

- BRASIL (2010) Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de Controle da Tuberculose.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V et al (2006) *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol 6:23.
- Brzostek A, Sajduda A, Sliwinski T, Augustynowicz-Kopec E, Jaworski A, Zowolska Z and Dziadek J (2004) Molecular characterisation of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. Int J Tuberc Lung Dis 8:1032-1035.
- Chakravorty S, Aladegbami B, Motiwala AS, Dai Y, Safi H, Brimacombe M, Helb D and Alland D (2008) Rifampin resistance, Beijing-W clade–single nucleotide polymorphism cluster group 2 phylogeny, and the Rv2629 191-C allele in *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 46:2555–2560.
- Chuang P, Chen H and Ruwen J (2010) Single-nucleotide polymorphism in the *fadD28* gene as a genetic marker for East Asia Lineage *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 48:4245-4247.
- Cohen T, Sommers B and Murray M (2003) The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet Infect Dis 3:13–21.
- Cohen T and Murray M (2004) Modeling epidemics of multidrug-resistant *M. tuberculosis* of heterogeneous fitness. Nat Med 10:1117-1121.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd et al (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 393:537-544.
- Cole ST (2002) Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology 148: 2919-2928.
- Coll P (2003) Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Enferm Infecc Microbiol Clin 21: 299-308.
- Comas I, Homolka S, Niemann S and Gagneux S (2009) Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. PLoS ONE 4:e7815.
- Daniel TM (2006) The history of tuberculosis. Respir Med 100:1862–1870.
- Davies AP, Billington OJ, Bannister BA, Weir WR, McHugh TD and Gillespie SH (2000) Comparison of fitness of two isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, one of which

had developed multi-drug resistance during the course of treatment. *J Infect* 41:184–187.

- De la Iglesia AI and Morbidoni HR (2006) Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Rev Argent Microbiol* 38: 97-109.
- De Rossi E, Aínsa JA and Riccardi G (2006) Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev* 30:36–52.
- Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA and Santos DS (2006) The resumption of consumption - A review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:697-714.
- Evans JT, Hawkey PM, Smith EG, Boese KA, Warren RE and Hong G (2004) Automated high-throughput mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains by a combination of PCR and nondenaturing high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 42:4175-4180.
- Feuerriegel S, Cox HS, Zarkua N, Karimovich HA, Braker K, Rusch-Gerdes S and Niemann S (2009) Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3353–3356.
- Filliol I, Ferdinand S, Negroni L, Sola C and Rastogi N (2000) Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *J Clin Microbiol* 38:2520-2524.
- Filliol I, Motiwala AS, Cavatore M, Qi W, Hazbón MH, del Valle MB, Fyfe J, Garcia-Garcia L, Rastogi N, Sola C et al (2006) Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol* 188:759-772.
- Finken M, Krischner P, Meier A, Wrede A and Bottger EC (1993) Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* 9:1239-1246.
- Flynn JL and Chan J (2005) What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol* 13: 98-102.
- Fukuda M, Koda H, Ohno H, Yang B, Hirakata Y, Maesaki S, Tomono K, Tashiro T and Kohno S (1999) Relationship between genetic alteration of the *rpsL* gene and streptomycin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Antimicrob Chemother* 43:281-284.
- Gagneux S (2009) Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol Infect* 15:66–68.

- Gagneux S and Small PM (2007) Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 7: 328–337.
- Gagneux S, Burgos MV, DeRiemer K, Encisco A, Muñoz S, Hopewell PC, Small PM and Pym AS (2006a) Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2: e61.
- Gagneux S, DeRiemer K, Vanb T, Kato-Maedab M, de Jong BC, Narayanang S, Nicolh M, Niemanni S, Kremer K, Gutierrez MC et al (2006b) Variable host–pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 103: 2869-2873.
- Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK and Bohannan BJ (2006c) The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 312: 1944–1946.
- Gibson AL, Huard RC, van Pittius NCG, Lazzarini LCO, Driscoll J, Kurepina N, Zozio T, Sola C, Spindola SM, Kritski AL et al (2008) Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family. *J Clin Microbiol* 46:1259-1267.
- Golden MP and Vikram HR (2005) Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician* 72:1761-1768.
- Goulding JN, Stanley J, Sauders N and Arnold C (2000) Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 38:1121-1126.
- Gutacker MM, Mathema B, Soini H, Shashkina E, Kreiswirth BN, Graviss EA and Musser JM (2006) Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J Infect Dis* 193:121-128.
- Homolka S, Köser C, Archer J, Rüscher-Gerdes S and Niemann S (2009) Single-nucleotide polymorphisms in Rv2629 are specific for *Mycobacterium tuberculosis* genotypes Beijing and Ghana but not associated with rifampin resistance. *J Clin Microbiol* 47:223-226.
- Honoré N and Cole ST (1994) Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 38:238-242.
- Jugheli L, Bzekalava N, Rijk P, Fissette K, Portaels F and Rigouts L (2009) High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5064–5068.

- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M and van Embden J (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35:907-914.
- Kaufmann SHE and Schaible UE (2005) 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends Microbiol* 13:469-475.
- Kyslik P, Dobisova M, Maresova H and Sobotkova L (1993) Plasmid burden in chemostat culture of *E. coli* – its effect on the selection for overproducers of host enzymes. *Biotechnol Bioeng* 41:325-329.
- Levin BR, Perrot V and Walker N (2000) Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* 154: 985–997.
- Luciani F, Sissonb SA, Jiangb H, Francis AR and Tanaka MM (2009) The epidemiological fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 106:14711–14715.
- Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE and Andersson DI (2004) Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1289–1294.
- Marttila HJ, Soini H, Eerola E, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, Vasilyef AV and Viljanen MK (1998) A Ser315Thr substitution in *KatG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St Petersburg area in Russia. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2443-2445.
- Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ and Kreiswirth BN (2006) Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev* 19:658–685.
- Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C and Supply P (2001) High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1901-1906.
- Meier A, Sander P, Schaper KJ and Böttger EC (1996) Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 40:2452–2454.
- Mokrousov I, Otten T, Manicheva O, Potapova Y, Vishnevsky B, Narvskaya O and Rastogi N (2008) Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2937–2939.
- Normark BH and Normark S (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* 252:91–106.

- Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y, Tokuyama S, Suzuki Y and Ochi K (2007) Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol Microbiol* 63:1096-1106.
- Ottenhoff THM (2009) Overcoming the global crisis: “Yes, we can”, but also for TB? *Eur J Immunol* 39: 1991– 2058.
- Pym AS, Saint-Joanis B and Cole ST (2002) Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun* 70: 4955–4960.
- Reynolds MG (2000) Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics* 156:1471–1481.
- Riska PF, Jacobs WR and Alland D (2000) Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 4:S4-S10.
- Ruffino-Netto A (2002) Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 51-58.
- Saunders NJ, Trivedi UH, Thomson ML, Doig C, Laurenson IF and Blaxter ML (2011) Deep resequencing of serial sputum isolates of *Mycobacterium tuberculosis* during therapeutic failure due to poor compliance reveals stepwise mutation of key resistance genes on an otherwise stable genetic background. *J Infect* 62:212-217.
- Schrag SJ and Perrot V (1996) Reducing antibiotic resistance. *Nature* 381:120-121.
- Schrag SJ, Perrot V and Levin BR (1997) Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proc R Soc Lond B* 264:1287-1291.
- Schulz zur Wiesch P, Engelstadter J and Bonhoeffer S (2010) Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2085–2095.
- Sola C, Filliol I, Gutierrez MC, Mokrousov I, Vincent V and Rastogi N (2001) Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg Infect Dis* 7:390-396.
- Spies FS, da Silva PE, Ribeiro MO, Rossetti ML and Zaha A (2008) Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2947-2949.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN and Musser JM (1997) Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1024-1026.

- SVS (2010) Tuberculose no Brasil: avanços e perspectivas. Programa Nacional de controle da Tuberculose, PNCT/SVS. Comunicação pessoal. São Paulo, 2 de setembro de 2010.
- Taylor GM, Stewart GR, Cooke M, Chaplin S, Ladva S, Kirkup J, Palmer S and Young DB (2003) Koch's Bacillus – a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology* 149: 3213–3220.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K and Bodmer T (1993) Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341:647–650.
- Telenti A, Honoré N, Bernasconi C, March J, Ortega A, Heym B, Takiff HE and Cole ST (1997) Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *J Clin Microbiol* 35:719–723.
- Toungoussova OS, Caugant DA, Sandven P, Mariandyshev AO and Bjune G (2004) Impact of drug resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing genotype. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42:281–290.
- van Soolingen D, de Haas PE, van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H and Borgdorff MW (2000) Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Infect Dis* 182:1788-1790.
- van Soolingen D, Kremer K, and Hermans PWM. *In*: Palomino JC; Leão SC, Ritacco V. (2007) Chapter 9: Molecular Epidemiology: Breakthrough Achievements and Future Prospects. *Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care*. 1^a ed.
- Vilchèze C and Jacobs WR Jr (2007) The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol* 61:35-50.
- von Groll A, Martin A, Felix C, Sanmartin Prata PF, Honscha G, Portaels F, Vandame P, da Silva PEA and Palomino JC (2010) Fitness study of the RD^{Rio} lineage and Latin American Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58: 119–127.
- Warren RM, Streicher EM, Sampson SL, van der Spuy GD, Richardson M, Nguyen D, Behr MA, Victor TC and van Helden PD (2002) Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. *J Clin Microbiol* 40:4457-4465.
- WHO. World Health Organization (2010) Global tuberculosis control: WHO report 2010. Geneva, Switzerland.
- WHO. World Health Organization (2011) Tuberculosis MDR-TB & XDR-TB 2011 progress report. 23 de março de 2011.

Zhang Y (2005) The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:529-564.

Zhang Y and Yew WW (2009) Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 13:1320-1330.

Capítulo 2

Resistência a estreptomicina e polimorfismos linhagem específicos no gene *gidB* de *Mycobacterium tuberculosis*

CAPÍTULO 2. Resistência a estreptomicina e polimorfismos linhagem específicos no gene *gidB* de *Mycobacterium tuberculosis*.

Autores: Fernanda S. Spies, Andrezza W. Ribeiro, Daniela F. Ramos, Marta O. Ribeiro, Anandi Martin, Juan Carlos Palomino, Maria Lucia R. Rossetti, Pedro Eduardo A. da Silva and Arnaldo Zaha.

Aceito para publicação no Journal of Clinical Microbiology (JCM).

RESUMO

As mutações relacionadas com a resistência a estreptomicina nos genes *rpsL* e *rrs* são bem conhecidas e podem explicar em torno de 70% da resistência fenotípica. Recentemente, o gene *gidB* foi descrito como associado com baixo nível de resistência à estreptomicina em *Mycobacterium tuberculosis*. Mutações em *gidB* têm sido descritas com alta frequência, e esse gene parece ser bastante polimórfico, apresentando mutações pontuais e de fase de leitura ocorrendo em cepas resistentes e sensíveis à estreptomicina. Nesse estudo, mutações em *gidB* foram associadas com baixo nível de resistência à estreptomicina e ocorreram em 27% das cepas resistentes à estreptomicina sem mutações nos genes *rpsL* e *rrs*. Entretanto, a associação de certas mutações em *gidB* com a resistência a estreptomicina ainda precisa ser investigada, pois foram encontradas mutações em *gidB* em cepas sensíveis à estreptomicina. Isso ocorreu somente quando a cepa era resistente à rifampicina e isoniazida. Duas mutações específicas são muito frequentes neste e outros estudos em cepas resistentes e sensíveis à estreptomicina, essas mutações não foram consideradas como relacionadas com a resistência, mas como um polimorfismo. As cepas foram estratificadas de acordo com diferentes linhagens filogenéticas e foi demonstrado que o polimorfismo *gidB16* (alelo 16G) estava presente exclusivamente no genótipo *Latin American Mediterranean*, enquanto que o polimorfismo *gidB92* (alelo 92C) estava associado com a linhagem *Beijing* em outra população. Na amostra estudada, os dois polimorfismos de único nucleotídeo caracterizados podem distinguir as linhagens *Latin American Mediterranean* e *Beijing* das outras linhagens.

Streptomycin resistance and lineage specific polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* *gidB* gene

Fernanda S. Spies^{1,2}, Andrezza W. Ribeiro², Daniela F. Ramos⁴, Marta O. Ribeiro², Anandi Martin³, Juan Carlos Palomino³, Maria Lucia R. Rossetti², Pedro Eduardo A. da Silva⁴ and Arnaldo Zaha^{1,5*}

¹Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS - Porto Alegre, Brazil;

³Institute of Tropical Medicine - ITM - Antwerp, Belgium

⁴Universidade Federal do Rio Grande - FURG - Rio Grande, Brazil

⁵Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ABSTRACT

Mutations related to streptomycin-resistance in the *rpsL* and *rrs* genes are well known and can explain about 70% of this phenotypic resistance. Recently, the *gidB* gene was found to be associated with low level streptomycin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Mutations in *gidB* have been reported with high frequency, and this gene appears to be very polymorphic, with frameshift and point mutations occurring in streptomycin-susceptible and streptomycin-resistant strains. In this study, mutations in *gidB* appeared in 27% of streptomycin-resistant strains that contained no mutations in the *rpsL* or *rrs* genes and were associated with low-level streptomycin-resistance. However, the association of certain mutations in *gidB* with streptomycin-resistance needs to be further investigated as we also found mutations in *gidB* in streptomycin-susceptible strains. This occurred only when the strain was resistant to rifampicin and isoniazid. Two specific mutations appear very frequently in this and other studies in streptomycin-susceptible and resistant strains, these mutations were not considered as related to streptomycin-resistance, but as a polymorphism. We stratified the strains according to the different phylogenetic lineages and showed that the *gidB*¹⁶ polymorphism (16G allele) was exclusively present in the Latin American Mediterranean genotype, while the *gidB*⁹² polymorphism (92C allele)

was associated with the Beijing lineage in another population. In the sample studied, the two characterized single nucleotide polymorphisms could distinguish Latin American Mediterranean and Beijing lineages from the other lineages.

INTRODUCTION

Acquired drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* arises from spontaneous chromosomal mutations. Clinical drug-resistant tuberculosis (TB) occurs when these genetic alterations are selected for during disease treatment. This can occur via erratic drug supply, suboptimal physician prescription and poor patient adherence (34).

The aminoglycoside antibiotic streptomycin (STR) was the first antibiotic used to control TB. It interacts directly with the small ribosomal subunit 16S rRNA and interferes with translational proofreading, thereby leading to inhibition of protein synthesis (14, 33). Mutations associated with high-level STR-resistance in *M. tuberculosis* have been identified in the genes encoding ribosomal protein S12 (*rpsL*) and 16S rRNA (*rrs*) (9). However, mutations in these two genes explain only about 70% of the cases of STR resistance in clinical isolates (22, 26), implying that there must be other loci involved or another mechanism for STR resistance.

Recently, it was shown that mutations in the gene encoding a 7-methylguanosine (m7G) methyltransferase (*gidB*) specific for the 16S rRNA results in low-level STR-resistance (20). However, in clinical isolates of *M. tuberculosis*, mutations in *gidB* have been observed in strains that are both susceptible and resistant to STR (20, 25).

Genotyping of *M. tuberculosis* strains is useful to answer evolutionary questions and for surveying its transmission dynamics in epidemiological studies (2). In addition, molecular typing improves our understanding of the basic biology of bacterial pathogens, including differences in virulence and transmissibility and the variable effectiveness of vaccines (7). Spoligotyping is a PCR-based genotyping technique, which exploits the variability of the direct repeat (DR) region in *M. tuberculosis* (16). Since 1999, genetic diversity databases have been organized for the *M. tuberculosis* complex DR locus as an attempt to analyze population structure and to assess the complexity of global TB transmission underlying the spatial and temporal evolution of the TB genetic landscape (3). The accumulated data demonstrate that a few major lineages of conserved spoligotypes are

well distributed throughout the world, whereas others are specific for certain geographic regions (3, 24).

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most robust and appropriate phylogenetically informative markers (7). Therefore, in recent years, some authors have proposed SNPs in phylogenetic studies (2, 8, 12). Some SNPs have been linked to specific *M. tuberculosis* phylogenetic lineages, such as a SNP in the *mgtC* gene (R182H), which can differentiate between Haarlem and non-Haarlem lineages (1), the variation in Rv2629 (N64A), which is found exclusively in lineages from Beijing (5, 13) and a SNP in *fadD28* codon 507, which acts as a specific marker for the East Asia lineage (6).

In the present study, we investigated mutations in the *gidB* gene in clinical isolates representative of the genetic diversity of *M. tuberculosis* to explore its possible involvement in STR-resistance in strains from southern Brazil. Furthermore, we stratified the strains according to the different phylogenetic lineages and showed that the *gidB*¹⁶ polymorphism (16G allele) was exclusively present in the Latin American Mediterranean (LAM) genotype and that the *gidB*⁹² polymorphism (92C allele) was associated with the Beijing lineage in another population.

MATERIAL AND METHODS

Strains. One hundred and six *M. tuberculosis* strains originating from the south of Brazil were isolated between 2005 and 2006 at LACEN-RS (Central Laboratory of Rio Grande do Sul State - Brazil), and 22 *M. tuberculosis* strains of Beijing genotype were acquired from the collection at the ITM (Institute of Tropical Medicine - Belgium).

MIC determination. The resazurin microtiter assay (REMA) was used for MIC determination (21). Briefly, 96-well plates were filled with 7H9–oleic acid-albumin-dextrose-catalase medium. Serial 1:2 dilutions of STR (125 µg/ml to 0.12 µg/ml), rifampicin (RIF) (16 µg/ml to 0.03 µg/ml) and isoniazid (INH) (12.8 µg/ml to 0.01 µg/ml) were performed in each column. The breakpoint used to determine STR resistance was an MIC of ≥ 1 µg/ml; INH and RIF resistance was considered with an MIC of ≥ 0.25 µg/ml (19).

DNA extraction and sequencing. DNA was isolated from mycobacterial cultures by a lysozyme/proteinase K cetyltrimethylammonium bromide procedure (28). A 306-bp fragment of the *M. tuberculosis rpsL* gene (GenBank accession number L08011) and the

530 (238 bp) and 912 region (238 bp) of the *rrs* gene (GenBank accession number X52917) were amplified as described by Tracevska et al. (27) and a 675-bp fragment of the gene *gidB* (GeneBank accession number AAK48404) was amplified as described by Spies et al. (25). Amplification products were sequenced using the ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems) and MegaBACE 1000 DNA analysis system (GE Healthcare Life Sciences). Nucleotide sequences were analyzed using the programs PREGAP and GAP4 of the STADEN software package ver. 10.0. Nucleotide sequences with Phred values >20 were considered for analysis.

Genotyping. Spoligotyping was performed using a commercial kit (Isogen Biosciences B.V., The Netherlands) and according to the manufacturer's instructions. Spoligopatterns obtained were entered in a binary format as Excel spreadsheets (Microsoft, Redmond, WA) and compared to the SITVIT database (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:0881/SITVITDemo/>) (3).

LAM-specific PCR. The strains were further characterized by a LAM-specific PCR to classify strains that could not be assigned to an internationally recognized genotype lineage or to confirm the spoligotyping result. In this assay, PCR primers identify the presence of an *IS6110* insertion (position 932204 according to the whole H37Rv genome sequence), which is unique to all members of the LAM lineage (17). PCR amplification products were electrophoretically fractionated in a 3.0% agarose gel, at 85 volts for two hours. The presence of a LAM strain was represented by a band of 205 base pairs, while a non-LAM strain was represented by a band of 141 base pairs (17).

RESULTS

Mutations in the *rpsL*, *rrs* and *gidB* genes and STR resistance

To analyze if mutations in *gidB* gene were related to STR resistance, we compared the mutations present in resistant and susceptible strains with sequencing data from *rpsL* and *rrs*, genes known to be related to STR-resistance.

Among the 40 STR-resistant strains, ten highly STR-resistant strains ($MIC \geq 125$ $\mu\text{g/ml}$) presented only the mutation in codon 43 (AAG→AGG, K43R) of the *rpsL* gene. One strain highly resistant to STR presented a mutation in codon 88 (AAG→AGG, K88R) of the *rpsL* gene and a mutation in codon 183 of the *gidB* gene (GCG→ACG, A183T), while another strain highly resistant to STR contained a silent mutation in codon 81 of the

rpsL gene (CTG→TTG, L81L), a frameshift mutation in codon 117 of the *gidB* gene (350 nucleotide G insertion) and a mutation in position 905 of the *rrs* gene (Table 1).

TABLE 1. Mutations in *rpsL*, *rrs* and *gidB* genes in resistant strains.

Phenotypic resistance ^a	<i>rpsL</i>	<i>rrs</i>	<i>gidB</i>	no. of strains	STR MIC
RH S					
	AAG→AGG, K43R	-	-	8	>125
	AAG→AGG, K88R	-	GCG→ACG, A183T	1	125
	CTG→TTG, L81L	905 A-G	117 frameshift (insG350)	1	125
	-	513 C-T	-	1	8
	-	513 C-T	-	1	72
	-	491 C-T	GCG→GAG, A200E	1	15
	-	491 C-T	-	1	8
	-	491 C-T	-	1	4
	-	-	TGG→TCG, W45S	1	2
	-	-	CCG→CTG, P84L	1	2
	-	-	CAT→TAT, H48Y	1	4
	-	-	-	6	2-8
H S					
	-	513 C-T	-	1	31
	-	-	GGT→CGT, G30R	1	15
	-	-	TGC→TGA C52stop	1	15
	-	491 C-T	-	1	8
	-	-	AAC→ACC, N52T	1	4
S					
	AAG→AGG, K43R	-	-	1	>125
	AAG→AGG, K43R	-	-	1	125
	-	904 C-G	-	1	125
	-	-	GGG→GAG, G117E	1	72
	-	-	39 frameshift (delC115)	1	8
	-	-	TTG→TTT, L79F	1	2
	-	-	CTA→CCA, L49P	1	8
	-	-	GGC→TGC, G164C	1	8
	-	-	-	3	2-8
Total				40	

^aR, rifampicin; H, isoniazid; S and STR, streptomycin

Three resistant strains presented a single C→T mutation in position 513 of the *rrs* gene and one strain contained C→G mutation in position 904. The C→T mutation in position 491 of the *rrs* gene appeared in four low-level resistant strains; three without mutations in the other studied genes and one with a mutation in codon 200 of the *gidB* gene (GCG→GAG, A200E) (Table 1). This mutation in position 491 of the *rrs* gene is also

present in two STR-susceptible strains, one of which also contains a mutation in codon 115 (GTG→GGG, V155G) of the *gidB* gene (Table 2).

TABLE 2. Mutations in *rpsL*, *rrs* and *gidB* genes in STR-susceptible strains.

Phenotypic resistance ^a	<i>rrs</i>	<i>gidB</i>	no. of strains	STR MIC
RH				
	-	-	32	0.12-1.0
	-	34 frameshift (delG100)	1	0.5
	491 C-T	GTG→GGG, V115G	1	≤0.12
	-	CCG→CTG, P84L	1	1
	-	CCG→CGG, P93R	1	1
	-	TCT→TTT, S100F	1	0.25
H				
	-	-	2	0.5
Susceptible				
	-	-	26	≤0.12-1.0
	491 C-T	-	1	1
Total			66	

^aR, rifampicin; H, isoniazid; S and STR, streptomycin

Ten strains with low-level STR-resistance presented different mutations in the *gidB* gene (TGG→TCG, W45S; CCG→CTG, P84L; CAT→TAT, H48Y; GGT→CGT, G30R; TGC→TGA, C52stop; 51 AAC→ACC, N51T; 39 frameshift; TTG→TTT, L79F; CTA→CCA, L49P; 164 GGC→TGC, G164C) and one with intermediate level resistance presented the mutation GGG→GAG, G117E (Table 1). Nine STR-resistant strains presented no mutations in the fragments of the genes studied (STR-MIC from 8 until 2 µg/ml).

Of the 66 STR-susceptible strains, 60 did not present any mutation in the DNA fragments of the studied genes. Six strains presented mutations, five of which contained mutations in the *gidB* gene (34 frameshift; CCG→CTG, P84L; CCG→CGG, P93R; TCT→TTT, S100F; GTG→GGG, V115G). Additionally, all five of the strains containing *gidB* mutations were RIF and INH-resistant (Table 2). No susceptible strain had mutations in the *rpsL* gene.

Highly frequent *gidB*¹⁶ polymorphism and LAM lineage

Apart from the several *gidB* mutations that appeared in single strains (Tables 1 and 2), one particular mutation, *gidB*¹⁶ (CTT→CGT, L16R), appeared frequently (n=63, 60%)

in this study population and was identified in 24 resistant and 39 susceptible strains. Therefore, this mutation was not considered as a mutation related to STR-resistance, but as a polymorphism and was not included in Tables 1 and 2.

TABLE 3. Spoligotyping of the strains and *gidB*¹⁶ polymorphism.

Spoligotyping lineage	LAM-specific PCR	no. of isolates	16G allele	16T allele
H1 ^a	Non-LAM	2	-	2
H2	Non-LAM	1	-	1
H3	Non-LAM	10	-	10
S	Non-LAM	2	-	2
T1	Non-LAM	4	-	4
T1 (T4-CE1 ancestor?)	Non-LAM	4	-	4
T2	Non-LAM	1	-	1
T3	Non-LAM	2	-	2
T5_MAD2	Non-LAM	5	-	5
X1	Non-LAM	1	-	1
X2	Non-LAM	1	-	1
LAM1 ^b	LAM	9	9	-
LAM2	LAM	8	8	-
LAM3	LAM	4	4	-
LAM3 and S /convergent	Non-LAM	1	-	1
LAM4	LAM	3	3	-
LAM5	LAM	14	14	-
LAM6	LAM	3	3	-
LAM9	LAM	12	12	-
U ^c	6 LAM	10	6	-
	4 Non-LAM		-	4
No SIT in SpolDB4 ^d	4 LAM	9	4	-
	5 Non-LAM		-	5
Total		106 (100%)	63 (60%)	43 (40%)

^aH, Haarlem; ^bLAM, Latin-American-Mediterranean; ^cU, unknown; ^dSIT, Shared International Type; SpolDB4, Spoligotyping Data Base 4.

The presence of this polymorphism was compared according to the distribution of spoligotype lineages, and we observed a very strong association between 16G allele and the LAM lineage (Table 3). To confirm this, all strains were analyzed using a LAM-specific PCR test.

Of the 54 strains that had the spoligopattern determined as LAM, 53 presented the 16G allele and were confirmed by the LAM-specific PCR test. One strain that belongs to the LAM3 and S /convergent sublineage had a 16T allele in *gidB* gene and was not considered to belong to the LAM lineage by the LAM-specific PCR (Table 3).

All strains belonging to the Haarlem, T, S, and X lineages were considered as non-LAM by the LAM-specific PCR test and contained the 16T allele in *gidB* gene (Table 3).

From the ten strains belonging to the Unknown lineage, six were classified as LAM by the LAM-specific PCR test and all six also presented the 16G allele. Nine strains presented no shared international type (SIT), and four of them also had the same *gidB*¹⁶ polymorphism (16G allele) and were identified as LAM by the LAM-specific PCR test (Table 3).

Polymorphism in *gidB*⁹² and Beijing family

Interestingly, previous reports identified a different *gidB* mutation that appears frequently within a population. According to Via et al. (29), the majority of the isolates studied (85%) contained an A-C SNP at nucleotide 276 (GAA→GAC, E92D). According to Okamoto et al. (20), the majority of the clinical isolates studied (70%) had this same polymorphism E92D, and they did not consider this alteration to be related to STR resistance.

This polymorphism was not found in our Brazilian sample, and because there is a different distribution of lineages around the world, we decided to test the possible relationship of this polymorphism with the Beijing genotype. We sequenced the *gidB* gene in 22 Beijing strains to better understand this correlation and found that all of these strains had the 92C allele in the *gidB* gene (GAA→GAC, E92D) as well as the 16T allele. Consequently, they were classified as non-LAM strains, and confirmed the relationship of the *gidB*⁹² polymorphism with the Beijing genotype.

DISCUSSION

Genetic resistance to anti-tuberculosis drugs is due to spontaneous chromosomal mutations because no mobile genetic elements, such as plasmids or transposons, have been characterized in *M. tuberculosis*. Therefore, it is of critical importance to determine the mutations related to STR-resistance.

Mutations associated with STR-resistance in *rpsL* and *rrs* are well known. For example, the mutation in codon 43 of *rpsL* (found in ten strains in this study) is the most frequent mutation associated with high level STR-resistance (4, 10, 26), while the mutation at position 491 of *rrs* (found in 4 strains in this study) is not related to STR-resistance (30,

31). However, mutations in the *gidB* gene of *M. tuberculosis* possibly related to STR resistance have been described in other studies (20, 25, 29).

In this study, we analyzed 106 *M. tuberculosis* clinical isolates from Brazil and found that 18% (19/106) had mutations in *gidB* (without the L16R polymorphism). Only three resistant strains had also mutations in other genes associated with STR-resistance. Eleven of 40 STR-resistant strains (27%) had mutations only in *gidB*; ten had a low level of STR-resistance and one had intermediate resistance. According to other reports (22, 26), approximately 30% of STR-resistant strains lack mutations in *rpsL* or *rrs*. In our study, *gidB* mutations may explain 27% of strains that were resistant to STR without mutations in *rpsL* or *rrs*. However, nine strains (22%) considered STR-resistant had no mutations in *rpsL*, *rrs* or *gidB*.

We found five STR-susceptible strains with mutations in *gidB* that occurred only in RIF- and INH-resistant strains. No *gidB* mutation was observed in fully-susceptible strains. Okamoto et al. (20) came to the same conclusion, *gidB* mutations in STR-susceptible strains occurred in 15/51 strains resistant to INH and RIF but in only one (1/24) fully-susceptible strain.

Mutations in *gidB* have been reported frequently in other studies. Okamoto et al. (20) reported *gidB* mutations in 33% of STR-resistant strains. Spies et al. (25) found that 73% of isolates presented nucleotide mutations, and 5% with low-level STR-resistance had mutations only in *gidB*. In the study by Via et al. (29), 15 different polymorphisms in *gidB* from 21 isolates were described, including drug-susceptible and -resistant strains.

In addition to being frequently mutated, *gidB* seems to be very polymorphic. Apparently, mutations are not present at conserved sites, with the exception of the *gidB*¹⁶ and *gidB*⁹² polymorphisms, which are not associated with STR-resistance. Taking into account all published studies (20, 25, 29) and this one, a total of 414 *M. tuberculosis* strains have been sequenced for the *gidB* gene comprising strains from Japan (132), South Korea (97) and Brazil (185).

The frameshift mutations at codon 14, 36 and 64 each appeared in one susceptible strain. The frameshift mutations at codon 34, 39, 117 and 118 appeared in several strains each, both in STR-resistant and -susceptible strains. The frameshift mutation at codon 40 appeared only in one resistant strain that contained no additional mutations in the other STR-resistance associated genes.

Point mutations (substitutions) are more variable than the frameshift mutations and did not occur at conserved sites. Fifty-five different point mutations have been found in the *gidB* gene. Forty-three of them occurred only once: 21 in susceptible strains (L35R, W45R, V65A, V66M, L74S, V74A, V77A, R83L, P84R, P84C, P93R, P93Q, S100F, V115G, R116P, R118C, D132V, R137G, V139M, A183E, V188M), 10 in resistant strains with mutations in *rpsL* and/or *rrs* (E40stop, R47Q, I55S, E57stop, R96R, E103stop, L128S, K147T, A183T, V188G) and 12 in resistant strains with no mutations in the *rpsL* and/or *rrs* genes (G30R, W45C/V110V/W148R, W45S, H48Y, L49P, N51T, C52stop, D67H, P75S/V110V/A141A, P75A, G117E, G164C).

While investigating the evolution of drug-resistance in the KwaZulu-Natal family of *M. tuberculosis*, Ioerger et al. (15) reported a distinct *gidB* mutation, a 130 bp deletion (spanning amino acids 50–93 encompassing the SAM-binding site) that causes a frameshift in the C-terminal remainder, which they presumed to completely abrogate the function of the protein. This deletion was found in both drug-resistant (MDR and XDR) and in one STR-susceptible strain.

It will be necessary to sequence more clinical isolates of *M. tuberculosis* to better understand the role of *gidB* gene mutations in STR-resistance, thus, allowing a more accurate identification of mutations relevant for STR resistance. Nevertheless, *gidB* gene mutations appearing in STR-resistant strains with no additional mutations in other genes seem to be associated with low-level resistance to STR. Low-level antibiotic resistance is frequently required as an initial step for the emergence of high-level resistance. If the bacterial population is not killed effectively by a given antibiotic, the cells will remain under stress, and this may increase the mutation rate (18).

Okamoto et al. (20) found that 70% (93/132) of clinical isolates had the amino acid substitution E92D in *gidB*. We previously found the L16R substitution in 49% (39/79) of clinical isolates (25). Via et al. (29) found 85% (83/97) of isolates containing a point mutation in E92D of *gidB*.

Taking all this into account, we can observe that polymorphism *gidB*⁹² (GAA→GAC, E92D) was found more frequently among strains from Asia and polymorphism *gidB*¹⁶ (CTT→CGT, L16R) was very frequent among strains from Brazil. According to Brudey et al. (3), Beijing and Beijing-like strains represent about 50% of the strains from Far East-Asia (such as Japan and South Korea), and the LAM lineage

corresponds only to 5% of the strains. In South America, about 50% of the strains belong to the LAM lineage, and the Beijing genotype is rarely observed. In Brazil, only 0.8% of the strains have been reported as Beijing genotype (23).

We have successfully characterized two SNPs that can distinguish LAM and Beijing lineages. All strains belonging to LAM lineage by LAM-specific PCR had the SNPs in codon 16 (G allele) and codon 92 (A allele) of *gidB* indicating their belonging to the LAM and non-Beijing lineages. Similarly, all Beijing strains characterized by spoligotyping had the SNPs in codon 16 (T allele) and codon 92 (C allele) in *gidB*; thus, they were classified as non-LAM/Beijing strains. However, since we have analyzed only samples from Brazil and Asian countries, it will be important to extend these studies to samples from other geographic regions.

One strain gave discordant results; it was classified as LAM3 and S/convergent sublineage by spoligotyping, but as non-LAM by the LAM-specific PCR and by *gidB*¹⁶ polymorphism. Spoligotypes evolve through successive loss of spacer DNA sequences (16), and since lineages are defined by spacer patterns, the independent loss of similar spacers sets can lead to the convergent evolution of spoligotypes (32). This is problematic because not all strains may truly represent their designed spoligotyping lineage (11). This may explain the discrepant result found in this study, indicating that a convergence of spoligotype may have occurred. The same has been reported by Gibson et al. (11) where strains classified as LAM by spoligotyping were considered as non-LAM by LAM-specific PCR and SNP analysis.

When some spoligotyping patterns could not be assigned to an internationally recognized genotype lineage, we were able to differentiate these strains as LAM or non-LAM by the *gidB*¹⁶ polymorphism and LAM-specific PCR, indicating that spoligotyping alone is not always the best method to differentiate LAM strains.

In conclusion, we have described two SNPs in the *gidB* gene that allowed us to distinguish LAM and Beijing lineages from the other lineages in *M. tuberculosis*. The previously reported association of certain mutations in *gidB* with resistance to STR needs to be further investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNPq and the Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS). F.S.S. is a recipient of a CNPq fellowship.

REFERENCES

1. **Alix, E., S. Godreuil, and A. B. Blanc-Potard.** 2006. Identification of a Haarlem genotype-specific single nucleotide polymorphism in the *mgtC* virulence gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2093-2098.
2. **Bouakaze, C., C. Keyser, S. J. De Martino, W. Sougakoff, N. Veziris, H. Dabernat, and B. Ludes.** 2010. Identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex species by use of a SNaPshot minisequencing-based assay. *J. Clin. Microbiol.* **48**:1758-1766.
3. **Brudey, K., J. R. Driscoll, L. Rigouts, W. M. Prodinger, A. Gori, S. A. Al-Hajoj, C. Allix, L. Aristimuño, J. Arora, V. Baumanis, L. Binder, P. Cafrune, A. Cataldi, S. Cheong, R. Diel, C. Ellermeier, J. T. Evans, M. Fauville-Dufaux, S. Ferdinand, D. G. de Viedma, C. Garzelli, L. Gazzola, H. M. Gomes, M. C. Gutierrez, P. M. Hawkey, P. D. van Helden, G. V. Kadival, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, M. Kubin, S. P. Kulkarni, B. Liens, T. Lillebaek, H. M. Ly, C. Martin, C. Martin, I. Mokrousov, O. Narvskaia, Y. F. Ngeow, L. Naumann, S. Niemann, I. Parwati, Z. Rahim, V. Rasolofoa-Razanamparany, T. Rasolonavalona, M. L. Rossetti, S. Rüsck-Gerdes, A. Sajduda, S. Samper, I. G. Shemyakin, U. B. Singh, A. Somoskovi, R. A. Skuce, D. van Soolingen, E. M. Streicher, P. N. Suffys, E. Tortoli, T. Tracevska, V. Vincent, T. C. Victor, R. M. Warren, S. F. Yap, K. Zaman, F. Portaels, N. Rastogi, and C. Sola.** 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* **6**:23.
4. **Brzostek, A., A. Sajduda, T. Sliwinski, E. Augustynowicz-Kopec, A. Jaworski, Z. Zowolska, and J. Dziadek.** 2004. Molecular characterisation of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **8**:1032-1035.
5. **Chakravorty, S., B. Aladegbami, A. S. Motiwala, Y. Dai, H. Safi, M. Brimacombe, D. Helb, and D. Alland.** 2008. Rifampin resistance, Beijing-W clade-single nucleotide polymorphism cluster group 2 phylogeny, and the Rv2629 191-C allele in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2555-2560.
6. **Chuang, P., H. Chen, and J. Ruwen.** 2010. Single-nucleotide polymorphism in the *fadD28* gene as a genetic marker for East Asia Lineage *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **48**:4245-4247.
7. **Comas, I., S. Homolka, S. Niemann, and S. Gagneux.** 2009. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS ONE.* **4**:e7815.
8. **Filliol, I., A. S. Motiwala, M. Cavatore, W. Qi, M. H. Hazbón, M. B. del Valle, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, N. Rastogi, C. Sola, T. Zozio, M. I. Guerrero, C. I. León, J. Crabtree, S. Angiuoli, K. D. Eisenach, R. Durmaz, M. L. Joloba, A. Rendón, J.**

- Sifuentes-Osornio, A. Ponce de León, M. D. Cave, R. Fleischmann, T. S. Whittam, and D. Alland.** 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J. Bacteriol.* **188**:759-772.
9. **Finken, M., P. Krischner, A. Meier, A. Wrede, and E. C. Bottger.** 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol. Microbiol.* **9**:1239-1246.
 10. **Fukuda, M., H. Koda, H. Ohno, B. Yang, Y. Hirakata, S. Maesaki, K. Tomono, T. Tashiro, and S. Kohno.** 1999. Relationship between genetic alteration of the *rpsL* gene and streptomycin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:281-284.
 11. **Gibson, A. L., R. C. Huard, N. C. G. van Pittius, L. C. O. Lazzarini, J. Driscoll, N. Kurepina, T. Zozio, C. Sola, S. M. Spindola, A. L. Kritski, D. Fitzgerald, K. Kremer, H. Mardassi, P. Chitale, J. Brinkworth, D. G. de Viedma, B. Gicquel, J. W. Pape, D. van Soolingen, B. N. Kreiswirth, R. M. Warren, P. D. van Helden, N. Rastogi, P. N. Suffys, J. Lapa e Silva, and J. L. Ho.** 2008. Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family. *J. Clin. Microbiol.* **46**:1259-1267.
 12. **Gutacker, M. M., B. Mathema, H. Soini, E. Shashkina, B. N. Kreiswirth, E. A. Graviss, and J. M. Musser.** 2006. Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *J. Infect. Dis.* **193**:121-128.
 13. **Homolka, S., C. Köser, J. Archer, S. Rüsç-Gerdes, and S. Niemann.** 2009. Single-nucleotide polymorphisms in Rv2629 are specific for *Mycobacterium tuberculosis* genotypes Beijing and Ghana but not associated with rifampin resistance. *J. Clin. Microbiol.* **47**:223-226.
 14. **Honoré, N., and S. T. Cole.** 1994. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:238-242.
 15. **Ioerger, T. R., S. Koo, E. G. No, X. Chen, M. H. Larsen, W. R. Jacobs Jr, M. Pillay, A. W. Sturm, and J. C. Sacchettini.** 2009. Genome analysis of multi- and extensively-drug-resistant tuberculosis from KwaZulu-Natal, South Africa. *PLoS ONE.* **4**:e7778.
 16. **Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden.** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **35**:907-914.
 17. **Marais, B. J., T. C. Victor, A. C. Hesselning, M. Barnard, A. Jordaan, W. Brittle, H. Reuter, N. Beyers, P. D. van Helden, R. M. Warren, and H. R. Schaaf.** 2006. Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape province of South Africa. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3539-3543.
 18. **Martinez, J. L., and F. Baquero.** 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1771-1777.
 19. **Montoro, E., D. Lemus, M. Echemendia, A. Martin, F. Portaels, and J. C. Palomino.** 2005. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test,

- and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:500-505.
20. **Okamoto, S., A. Tamaru, C. Nakajima, K. Nishimura, Y. Tanaka, S. Tokuyama, Y. Suzuki, and K. Ochi.** 2007. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* **63**:1096-1106.
 21. **Palomino, J. C., A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, and F. Portaels.** 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2720-2722.
 22. **Riska, P. F., W. R. Jacobs, and D. Alland.** 2000. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **4**:S4-S10.
 23. **Ritacco, V., B. López, P. I. Cafrune, L. Ferrazoli, P. N. Suffys, N. Candia, L. Vásquez, T. Realpe, J. Fernández, K. V. Lima, J. Zurita, J. Robledo, M. L. Rossetti, A. L. Kritski, M. A. Telles, J. C. Palomino, H. Heersma, D. van Soolingen, K. Kremer, and L. Barrera.** 2008. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **103**:489-492.
 24. **Sola, C., I. Filliol, M. C. Gutierrez, I. Mokrousov, V. Vincent, and N. Rastogi.** 2001. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg. Infect. Dis.* **7**:390-396.
 25. **Spies, F. S., P. E. da Silva, M. O. Ribeiro, M. L. Rossetti, and A. Zaha.** 2008. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2947-2949.
 26. **Sreevatsan, S., X. Pan, K. E. Stockbauer, D. L. Williams, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 1997. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1024-1026.
 27. **Tracevska, T., I. Jansone, A. Nodieva, O. Marga, G. Skenders, and V. Baumanis.** 2004. Characterisation of *rpsL*, *rrs* and *embB* mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res. Microbiol.* **155**:830-834.
 28. **van Soolingen, D., P. E. de Hass, P. W. Hermans, and J. D. van Embden.** 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.* **235**:196-205.
 29. **Via, E. L., S. Cho, S. Hwang, H. Bang, S. K. Park, H. S. Kang, D. Jeon, S. Y. Min, T. Oh, Y. Kim, Y. M. Kim, V. Rajan, S. Y. Wong, I. C. Shamputa, M. Carroll, L. Goldfeder, S. A. Lee, S. M. Holland, S. Eum, H. Lee, and C. E. Barry.** 2010. Polymorphisms associated with resistance and cross-resistance to aminoglycosides and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from South Korean patients with drug-resistant tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **48**:402-411.
 30. **Victor, T. C., A. van Rie, A. M. Jordaan, M. Richardson, G. D. van der Spuy, N. Beyers, P. D. van Helden, and R. Warren.** 2001. Sequence polymorphism in the *rrs* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is deeply rooted within an evolutionary clade and is not associated with streptomycin resistance. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4184-4186.
 31. **Victor, T. C., P. E. W. Haas, A. M. Jordaan, G. D. van der Spuy, M. Richardson, D. van Soolingen, P. D. van Helden, and R. Warren.** 2004. Molecular characteristics

- and global spread of *Mycobacterium tuberculosis* with a western cape F11 genotype. J. Clin. Microbiol. **42**:769-772.
32. **Warren, R. M., E. M. Streicher, S. L. Sampson, G. D. van der Spuy, M. Richardson, D. Nguyen, M. A. Behr, T. C. Victor, and P. D. van Helden.** 2002. Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. J. Clin. Microbiol. **40**:4457-4465.
 33. **Zhang, Y.** 2005. The magic bullets and tuberculosis drug targets. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **45**:529-564.
 34. **Zhang, Y., and W. W. Yew.** 2009. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung Dis. **13**:1320-1330.

Capítulo 3

***Fitness* em isolados clínicos de *M. tuberculosis* com mutações nos genes *rpsL*, *rpoB* e *katG* medido pelo ensaio de redução quantitativa da resazurina**

CAPÍTULO 3. *Fitness* em isolados clínicos de *M. tuberculosis* com mutações nos genes *rpsL*, *rpoB* e *katG* medido pelo ensaio de redução quantitativa da resazurina

Autores: Fernanda S. Spies, Andrea Von Groll, Andrezza W. Ribeiro, Daniela F. Ramos, Marta O. Ribeiro, Elis Regina D. Costa, Anandi Martin, Juan Carlos Palomino, Maria Lucia R. Rossetti, Pedro Eduardo A. da Silva and Arnaldo Zaha.

Artigo em preparação para ser submetido à publicação no periódico Tuberculosis.

RESUMO

A aquisição de resistência aos antimicrobianos em bactérias é frequentemente associada com uma perda de *fitness*, enquanto algumas cepas com mutações de baixo ou nenhum custo têm sido relatadas. No presente estudo, o ensaio de redução quantitativa resazurina foi escolhido para estudar o *fitness* de isolados de *M. tuberculosis* com mutações nos genes *rpsL*, *rpoB* e *katG* e diferentes perfis de resistência, através de curvas de crescimento. Foi possível observar que algumas cepas cresceram mais lentamente do que as cepas sensíveis, como as cepas com mutações no gene *rpoB*, mas não em S531L, e cepas com mutações em todos os genes estudados ao mesmo tempo. Por outro lado, as cepas com a mutação no codon K43R de *rpsL* cresceram mais rapidamente que as cepas sensíveis. Cepas com mutações no codon S315T de *katG* apresentaram *fitness* heterogêneos. Algumas cepas com as mutações *rpsL43/katG315*, *rpoB531* e *rpoB531/katG315* cresceram mais rapidamente do que a média para as cepas sensíveis quando as cepas foram analisadas individualmente. Neste trabalho foi demonstrado que algumas cepas com as mutações mais frequentes relacionadas com a resistência em alto nível a estreptomicina, à isoniazida e rifampicina podem crescer tanto quanto ou até melhor do que a média para as cepas sensíveis.

Fitness in *Mycobacterium tuberculosis* with mutations in the *rpsL*, *rpoB*, and *katG* genes measured by quantitative resazurin reduction assay

Fernanda S. Spies^{1,2}, Andrea Von Groll⁴, Andrezza W. Ribeiro², Daniela F. Ramos⁴, Marta O. Ribeiro², Elis Regina D. Costa², Anandi Martin³, Juan Carlos Palomino³, Maria Lucia R. Rossetti², Pedro Eduardo A. da Silva⁴ and Arnaldo Zaha^{1,5*}

¹Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS - Porto Alegre, Brazil;

³Institute of Tropical Medicine - ITM - Antwerp, Belgium

⁴Universidade Federal do Rio Grande - FURG - Rio Grande, Brazil

⁵Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

SUMMARY

The acquisition of drug resistance in bacteria is often associated with a loss in fitness, while some strains with low- or no-cost mutations have been reported. In the present study, the quantitative resazurin reduction assay was chosen to study fitness of *M. tuberculosis* isolates with different mutations in the *rpsL*, *rpoB*, and *katG* genes and different resistance profiles, through growth curves. It was possible to observe that some strains grew slower than the susceptible strains, as the strains mutated in *rpoB* but not in S531L and strains with mutations in all genes studied at the same time. On the other hand, strains with *rpsL* K43R mutation grew better than the susceptible strains. Strains mutated in *katG* S315T presented heterogeneous fitness. Some strains with the mutations *rpsL*43/*katG*315, *rpoB*531, and *rpoB*531/*katG*315 grew faster than the average for the susceptible strains, when we analyzed strain by strain. Here we showed that some strains with the most frequent mutations related with high level streptomycin, isoniazid and rifampicin resistance, can grow as much as or even better than the average for the susceptible strains.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is considered as multidrug resistant (MDR) disease when *Mycobacterium tuberculosis* bacilli is resistant at least to rifampicin (RIF) and isoniazid (INH) drugs, the two main first-line drugs used for TB treatment. The resistance to these two drugs obliges the administration of less effective, more toxic, and more costly drugs.¹ The molecular mechanisms of resistance have been elucidated for many antituberculosis agents. Isolates have been shown to become resistant essentially through mutations occurring spontaneously at low frequency in chromosomal genes. In clinical practice, they are selected as a result of inadequate therapeutic regimens or patient failure to comply with adequate treatment.²

INH is the most widely used first-line anti-TB drug, and mutations in the *katG* gene is the main mechanism of INH resistance, *katG* S315T mutation is the most common in INH-resistant strains, accounting for 50–95% of INH-resistant clinical isolates.²⁻³ Several studies have shown that RIF-resistance is due to mutations in a defined region of the 81 base pair (bp) of the *rpoB* gene, which encodes the β -subunit of the RNA polymerase. Mutations in this region are found in about 96% of RIF-resistant *M. tuberculosis* strains recovered globally.⁴⁻⁵ Another first-line drug used in the TB treatment is streptomycin (STR), and high level STR-resistance strains present mutations in the *rpsL* gene which encodes the ribosomal protein S12.⁶

The acquisition of drug resistance in bacteria often carries a biological cost. This is because antibiotics generally target essential, highly conserved genes.⁷ Although drug-resistant strains often suffer an initial reduction in fitness, they continue to evolve by acquiring one or more secondary-site mutations that can improve or even restore the fitness over time.⁷ Furthermore, although the acquisition of drug resistance determinants is often associated with a loss in fitness, some strains with low- or no-cost mutations have been reported. For example, the most frequent mutation in *rpsL* gene related with STR-resistance, the mutation in codon 43 of the *rpsL* gene,⁸ the mutation *katG* S315T,⁹ and the mutation *rpoB* S531L were described as having a relative fitness greater than or equal to 1.0, which is considered the fitness of the susceptible strain.¹⁰

As cited above, most of the fitness studies are generally realized considering a mutation related with drug-resistance in one gene at a time, and only a few fitness studies have taken into account the possible variable effects of cumulative mutations in different

genes at the same time on TB fitness. The aim of this study was to compare the growth curves, measured by spectrophotometric quantification of resazurin reduction¹¹ in 21 MDR *M. tuberculosis* isolates with different mutations in the *rpsL*, *rpoB*, and *katG* genes and 3 susceptible isolates from southern Brazilian TB patients plus the reference strain H37Rv.

2. Material and methods

Strains - Twenty-one MDR (nine also STR-resistant) *M. tuberculosis* strains with different mutations in the genes *rpsL*, *rpoB*, and *katG* and 3 susceptible strains from TB patients in southern Brazil (LACEN-RS- Rio Grande do Sul central state laboratory collection) were selected to this study. Strain H37Rv was used as reference strain. The *M. tuberculosis* strains with the respective resistance profile and gene mutations are in the Table 1.

MIC determination - Resazurin microtiter assay (REMA) was used for MIC determination.¹² Microplates were filled with 7H9 plus 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase (7H9-OADC) medium. Serial 1:2 dilutions of STR (125 µg/ml to 0.25 µg/ml), RIF (16 µg/ml to 0.03 µg/ml) and INH (12.8 µg/ml to 0.01 µg/ml) were performed in each column. The breakpoint to determine STR resistance was a MIC of 1 µg/ml and for RIF and INH was 0.25 µg/ml.¹³

DNA Extraction and sequencing - DNA was isolated from mycobacterial cultures by the lysozyme/proteinase K cetyltrimethylammonium bromide procedure.¹⁴ A 306 bp fragment of the *M. tuberculosis rpsL* gene was amplified as described by Tracevska et al.¹⁵ using the primers SM1-CCAACCATCCAGCAGCTGGT and SM2-ATCCAGCGAACCGCGGATGA. The hot spot fragment of the *rpoB* gene (157 pb) was amplified as described in Telenti et al.⁴ using the primers RF1-GGTCGCCGCGATCAAGGAGT and RF2-TGCACGTCGCGGACCTCCA and the 232 bp fragment of the *katG* gene was amplified as described in Dalla Costa et al.³ using the primers KatG1-CATGAACGACGTCGAAACAG and KatG2-CGAGGAAACTGTTGTCCCAT. Sequencing was performed in the ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems). Nucleotide sequences were analyzed using the programs PREGAP and GAP4 of the STADEN software package ver. 10.0. Nucleotide sequences with Phred values >20 were considered for analysis.

Genotyping - Spoligotyping was performed using a commercial kit (Isogen Biosciences B.V., The Netherlands) according to the manufacturer instructions. The Shared

International Types (SITs) and families were identified according to the SpolDB4.¹⁶ The strains were further characterized by a LAM-specific PCR to classify strains that could not be assigned to an internationally recognized genotype lineage. In this assay, PCR primers identify the presence of an *IS6110* insertion, which is unique to all members of the LAM lineage.¹⁷ PCR amplification products were electrophoretically fractionated and the presence of a LAM strain was represented by a band of 205 base pairs, while a non-LAM strain was represented by a band of 141 base pairs.¹⁷

Fitness measurement - The fitness was measured by the growth time of the strains as indicated by resazurin reduction by mycobacterial metabolism quantified spectrophotometrically. The subcultures of the strains were made 21 days before the test in Löwenstein-Jensen medium. The inoculum was prepared as following: McFarland tube No. 1 in autoclaved water and diluted 1:20 in 7H9-OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase) medium (Becton Dickinson, USA). The plate was filled with 100 µl of 7H9-OADC medium in each well that will receive a inoculum plus the negative control (resazurin control), after that 100 µl of each inoculum were added in triplicate (in three different wells) and the plate was sealed and incubated at 37° C for 48 hours. Then 30 µl of the resazurin 0.02% was added and the plate returned to the incubator and the readings were performed every 12 hours for 7 days at 620 nm using a plate reader (TECAN Spectrum Classic). All tests were done in the same week with the same prepared reagents as 7H9 medium and resazurin. For the growth curve the average of the optical density (OD) of the triplicate for the same inoculum was calculated and diminished of the average for the negative control wells and compared in function of time (h). The fitness of each strain was estimated for two parameters¹¹ the length of the lag phase was determined from the time of starting the incubation until reaching an OD of 0.2 and the growth index was the time needed by each strain to reach an OD of 0.4 starting at an OD of 0.2. This time was calculated from the growth curve considering that all strains were in the logarithmic phase of growth between the two OD values.

Table 1. The resistance profile to RIF, INH and STR, mutation in the *rpsL*, *rpoB* and *katG* genes and the spoligotyping lineage in the strains studied.

strain no.	resistance ^a	mutation ^b	lineage
500201	MDR+S	rpsL43/katG315	T5_MAD2
500270	susceptible	susceptible	LAM1
500281	MDR+S	rpoB531/katG315	LAM5
500294	MDR+S	rpsL43/katG315	LAM
500425	MDR+S	rpoB531/katG315	H1
600007	MDR	rpoB531/ katG315	LAM9
600599	MDR	rpoB531	LAM9
600726	MDR+S	rpoB531/ katG315	LAM5
621042	susceptible	susceptible	T3
621044	MDR	rpoB531/ katG315	LAM5
621047	MDR+S	rpsL81/rpoB526Y/ katG315	H3
621049	MDR	rpoB531/ katG315	LAM5
621052	MDR+S	rpsL43/rpoB531/ katG315	T5_MAD2
621087	MDR	rpoB531/ katG315	LAM
621113	susceptible	susceptible	LAM2
621164	MDR	rpoB531/ katG315	LAM5
621172	MDR+S	rpsL43/rpoB526Y/ katG315	T5_MAD2
621173	MDR+S	rpsL43/rpoB531/ katG315	LAM6
621192	MDR	rpoB526P/ katG315	NÃO LAM
621230	MDR	rpoB531/ katG315	LAM5
621241	MDR	rpoB531/ katG315	LAM5
621242	MDR	rpoB531/ katG315	LAM5
621257	MDR	rpoB531/ katG315	LAM
6001061	MDR	rpoB531/ katG315	LAM5

^a MDR- strain phenotypic resistant to INH and RIF; MDR+S- strain phenotypic resistant to RIF, INH and STR. ^b *rpoB* - TCG→TTG, S531L; CAC→TAC, H526Y; CAC→CCC, H526P and ins 516 CCAGAACAACCC; *rpsL* - AAG→AGG, K43R and CTG→TTG, L81L; *katG*- AGC→ACC, S315T.

3. Results

Molecular characterization

From the 24 strains, three were classified as susceptible and without mutations in the sequenced genes. From the other 21 strains, nine were resistant to INH, RIF and STR (MDR+S), four had mutations on these three genes (rpsL81/rpoB526Y/katG315; rpsL43/rpoB531/katG315; rpsL43/rpoB526Y/katG315; rpsL43/rpoB531/katG315), three had mutations only in *rpoB* and *katG* (rpoB531/katG315) and two had mutations only in

the *rpsL* and *katG* genes (*rpsL*L43/*katG*G315). Twelve strains were resistant to INH, RIF (MDR), eight had the same mutation (*rpoB*S531/*katG*G315), another two also had the same mutation (*rpoB*ins516/*katG*G315), one had the mutation (*rpoB*S526P/*katG*G315) and another one had mutation only in *rpoB* (*rpoB*S531) (Table 1). The mutations found in *rpoB* are TCG→TTG, S531L; CAC→TAC, H526Y; CAC→CCC, H526P; and ins 516 CCAGAACAACCC; in *rpsL* are AAG→AGG, K43R and CTG→TTG, L81L and in *katG* is AGC→ACC, S315T.

Of the strains studied, 17 were classified by spoligotyping and LAM specific PCR as belonging to Latin American-Mediterranean lineage (sub lineages: three LAM, one LAM1, one LAM2, nine LAM5, one LAM6, and two LAM9) and seven were classified as non-LAM (sub lineages: three T5-MAD2, one Haarlem1, one Haarlem3, one T3, one non-LAM) (Table 1).

Biological cost

The length of lag phase and the growth index for all strains studied are given in Figure 1. In order to compare the growth of different strains we separated the strains in groups and compared the average of the different groups (Table 2). When we compared the length of lag phase among the susceptible, MDR+S and MDR, the MDR strains presented a faster growth than the susceptible and the MDR+S which was the slowest. Comparison of the growth index showed that the susceptible strains had the faster growth, followed by MDR and MDR+S.

After we separate the strains according to the mutations found in the genes *rpsL* and *rpoB*. The mutation in the *katG* gene was not analyzed in this moment because almost all strains had the same *katG* S315T mutation (20/21) and these strains had variable mutations in other genes and, in consequence, a heterogeneous fitness.

When strains with different mutations were compared, the lag phase was shorter in strains mutated in *rpsL* K43R, followed in order by: strains mutated in *rpoB* S531L, susceptible strains, strains mutated in *rpoB* not in S531L, and lastly the strains mutated in both genes that had the longest lag phase. The growth index for these groups shows that the faster group was again strains with mutations in *rpsL* K43R, but now followed in order by susceptible strains, *rpoB* S531L mutated strains, strains mutated in *rpoB* but not in

S531L, and lastly the strains with mutations in more than one gene had the slowest growth index (Table 2).

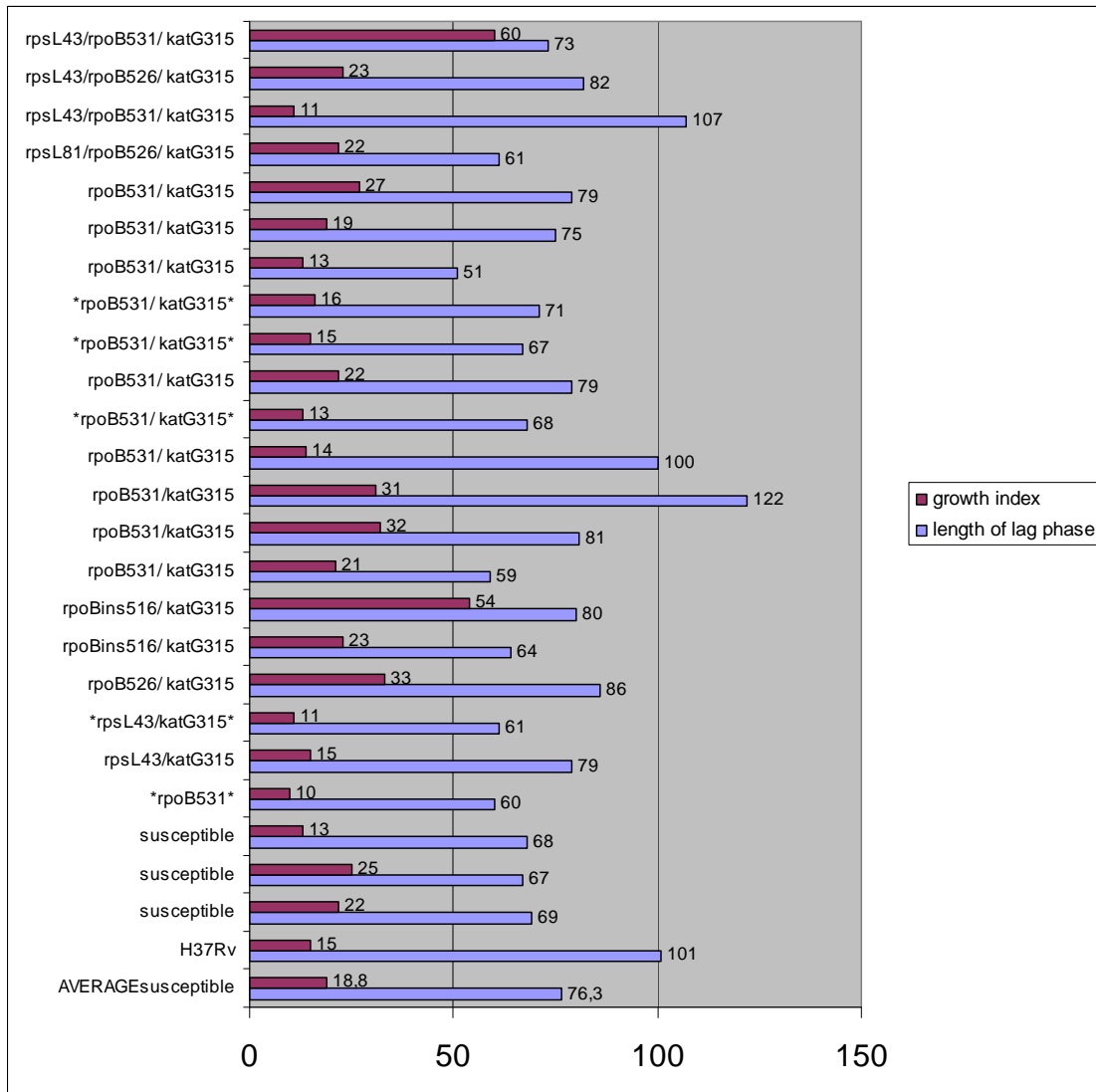


Figure 1. The growth index and the length of the lag phase for each strain. *strains that have the length of the lag phase and the growth index values lower than the average for the susceptible strains.

The comparison of the average of the susceptible strains with individual mutated strains shows that the individual mutated strains sometimes had the length of the lag phase and the growth index values lower than the average for the susceptible strains, demonstrating that some resistant strains grew faster than the average for the susceptible strains measured. This is the case of the strains mutated in rpsL43/katG315 (500294),

rpoB531 (600599), rpoB531/katG315 (600726, 621049, 621164), these strains are indicated in Figure 1.

The comparison between LAM and non-LAM strains, according to the length of the lag phase, the average of the group of LAM strains reach the OD of 0.2 in less time than the non-LAM strains and the growth index is almost the same for the two groups.

Table 2. Comparisons among different groups of strains.

comparison	no.	length of lag phase		growth index	
		average	st. deviation	average	st. Deviation
susceptible	4	76.3	16.5	18.8	5.7
MDR+S	9	81.6	20.6	24.2	15.6
MDR	12	72.6	13.5	22.3	11.9
WT	4	76.3	16.5	18.8	5.7
rpsL43	2	70.0	12.7	13.0	2.8
rpoB531	12	76.0	19.2	19.4	7.3
rpoB rare	3	76.7	11.4	36.7	15.8
rpsL and rpoB	4	80.8	19.5	29.0	21.4
non-LAM	7	86.3	21.6	22.9	7.9
LAM	17	70.9	11.2	22.6	14.3

MDR- strain phenotypic resistant to INH and RIF; MDR+S- strain phenotypic resistant to RIF, INH and STR; WT- wild type, strain without mutations in the studied genes.

4. Discussion

The spread of antimicrobial resistant strains is occurring despite the fact that resistance could have biological cost. The costs of resistance are among the most important factors determining both the rate and extent of resistance emergence.¹⁸

In this study MDR strains, including also STR-resistant, with the most frequent STR, RIF and INH drug resistance-conferring mutations were selected, some of them described as the most frequent in clinical strains in several studies. The *rpsL* K43R mutation is the most frequently associated with high level STR-resistant strains,^{6,19} the mutation *rpoB* S531L is one of the most frequent in clinical RIF-resistant strains^{2, 20} and the same occur with *katG* S315T mutation that was described in some settings to be related with more than 90% of the resistant INH strains.^{3, 20}

The strains are from different lineages as described by spoligotyping technique. Seventy-one percent of the strains were classified as belonging to LAM lineage and 29% as belonging to other lineages, including T and Haarlem lineages. These are the three main lineages described for South America, LAM lineage being the most frequent.^{3,16}

The length of the lag phase and the growth index of 21 *M. tuberculosis* MDR and 4 susceptible strains, including H37Rv were compared. We analyzed the growth curves of the strains using these two parameters and for that the strains were separated in groups to compare the average of these parameters for the different groups. The lag phase is the period required for adaptation of the bacteria to their new environment when enzymes are actively produced to metabolize novel nutrients, and the growth index is associated with the capacity of the bacteria for reproduction. Strains that are metabolically more active reproduce more rapidly.

It was possible to observe that some strains had a biological cost, observed in both parameters, as the MDR+S strains that grew slower than the other groups, as well as, the strains mutated in *rpoB* but not in codon 531 and strains with mutations in all genes studied: *rpoB*, *rpsL* and *katG* at the same time. In a study about fitness in MDR strains, was demonstrated that clinical isolates pay a physiological price for the development of MDR resistance.²¹ In the studies about *rpoB* gene the strains with mutations other than *rpoB* S531L were reported as having a fitness cost.^{10, 22}

In this study, on the other hand, we had strains that grew better than the susceptible strains in the length of the lag phase that was reached faster by strains with mutation in *rpoB* S531L and *rpsL* K43R (this last one also reached the log phase faster than susceptible strains). In the same studies about *rpoB* gene the mutation in *rpoB* S531L confers a relatively low fitness cost than the strains mutated in *rpoB* but not in S531L.^{10, 22}

Here the strains MDR+S (nine strains) grew slower than the susceptible strains. However, the MDR+S strains with the mutation *rpsL* K43R (two strains, without mutation in *rpoB*), had the opposite behavior. In a study on STR-resistance it was found that 89 among of 90 clinical isolates of STR-resistant *M. tuberculosis* had the mutation K43R in the *rpsL* gene and that this mutation was linked to unaltered virulence properties as determined experimentally in an *in vivo* model.²³

The strains mutated in *katG* S315T, presented heterogeneous fitness, because other mutations were variable in the other genes studied, but the most important is that when the two parameters were analyzed among individually mutated isolates with the average of the susceptible isolates, it was found that some isolates with the mutation *katG* S315T, but also in other genes, grew faster than the susceptible strains (1 strain: *rpsL*43/*katG*315 and 3 strains: *rpoB*531/*katG*315). It has been demonstrated that a strain with *katG* S315T

mutation retains virulence in a mouse model of tuberculosis, and that this mutant produced a functional catalase-peroxidase with enzymatic activities comparable to the wild-type, while leading to only a minimal reduction in fitness.⁹

The results of other experimental studies performed with strains resistant to INH, STR or RIF suggested that, in clinical settings, there was a strong selection pressure for drug resistance-conferring mutations that cause minimal fitness defects.⁷

The variable genetic background of strains belonging to different strain lineages could play a role in the fitness of *M. tuberculosis*.⁷ The strains from different lineages were analyzed and the LAM strains showed a faster growth in the length of the lag phase but they reach the OD of 0.4 in the same hours as non-LAM strains. von Groll et al.²⁴ studied Brazilian samples using the same method to measure the growth curves between LAM and non-LAM strains and found that LAM strains had a significantly faster growth index compared with non-LAM strains, but in this study the strains were susceptible, and only one (1/40) MDR strain was studied.

The strains studied here are clinical isolates from TB patients and since the genetic backgrounds of the organisms in this study are different and uncontrolled and the number of strains examined was limited, the results must therefore be interpreted with caution. Thus, possible genetic differences besides the point mutations in the *rpsL*, *rpoB* and *katG* genes can also explain the growth parameters. And also mutations responsible for drug resistance development that decrease growth and initial fitness can be compensated by later mutations that restore bacteria's capacity for growth.¹⁸

The important lesson these clinical and molecular studies teach us is that some resistant organisms can spread over time due to a natural selection of strains without biological cost. In order to prevent an epidemic of MDR-TB we must take care to ensure that all patients are diagnosed and effectively treated avoiding the occurrence and transmission of resistant strains in the community.²⁵ In conclusion, if the outcome of the drug resistance depends on the fitness of the resistant strains, we need to know the fitness of the strains spread in our population. Here we showed based on the growth curves from clinical strains that some strains with the most frequent mutations related with no fitness cost in other studies and high level SMR, INH and RIF resistant can grow as much as or even better than the average for the susceptible strains.

References

1. De La Iglesia AI, Morbidoni HR. Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Rev Argent Microbiol* 2006;**38**:97-109.
2. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;**13**:1320–30.
3. Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, et al. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol* 2009;**9**:39.
4. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;**341**:647–50.
5. Aslan G, Tezcan S, Serin MS, Emekdas G. Genotypic analysis of isoniazid and rifampin resistance in drug-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Southern Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2008;**61**:255-60.
6. Fukuda M, Koga H, Ohno H, Yang B, Hirakata Y, Maesaki S, et al. Relationship between genetic alteration of the *rpsL* gene and streptomycin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Antimicrobial Chemother* 1999;**43**:281–4.
7. Borrel S, Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;**13**:1456–66.
8. Böttger EC, Springer B. Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. *Eur J Pediatr* 2008;**167**:141-8.
9. Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun* 2002;**70**:4955–60.
10. Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohanna B. The Competitive Cost of Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 2006;**312**:1944-6.
11. von Groll A, Martin A, Portaels F, da Silva PEA, Palomino JC. Growth kinetics of *Mycobacterium tuberculosis* measured by quantitative resazurin reduction assay: a tool for fitness studies. *Brazilian J of Microbiol* 2010;**41**:300-3.
12. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;**46**:2720-2.
13. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin

microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2005;**55**:500-5.

14. van Soolingen D, de Hass PE, Hermans PW, van Embden JD. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol* 1994;**235**:196-205.

15. Tracevska T, Jansone I, Nodieva A, Marga O, Skenders G, Baumanis V. Characterisation of *rpsL*, *rrs* and *embB* mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 2004;**155**:830-4.

16. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 2006;**6**:23.

17. Marais BJ, Victor TC, Hesselning AC, Barnard M, Jordaan A, Brittle W, et al. Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape province of South Africa. *J Clin Microbiol* 2006;**44**:3539-43.

18. Schulz zur Wiesch P, Engelstadter J, Bonhoeffer S. Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;**54**:2085-95.

19. Spies FS, da Silva PE, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;**52**:2947-9.

20. Sajduda A, Brzostek A, Poplawska M, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Niemann S, Dziadek J, Hillemann D. Molecular characterization of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:2425-31.

21. Davies AP, Billington OJ, Bannister BA, Weir WR, McHugh TD, Gillespie SH. Comparison of fitness of two isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, one of which had developed multi-drug resistance during the course of treatment. *J Infect* 2000;**41**:184-7.

22. Billington OJ, McHugh TD, Gillespie SH. Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;**43**:1866-9.

23. Böttger EC, Springer B, Pletschette M, Sander P. Fitness of antibiotic-resistant microorganisms and compensatory mutations. *Nat Med* 1998;**12**:1343-4.

24. von Groll A, Martin A, Felix C, Sanmartin Prata PF, Honscha G, Portaels F, Vandame P, da Silva PEA, Palomino JC. Fitness study of the RD^{Rio} lineage and Latin American Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;**58**:119-27.

25. Gillespie SH. Antibiotic resistance in the absence of selective pressure. *Int J of Antimicrobial Agents* 2001;**17**:171–6.

Capítulo 4

Fitness* em isolados clínicos de *M. tuberculosis* com mutações no genes *rpsL*, *rrs*, *gidB* and *rpoB

CAPÍTULO 4. *Fitness* em isolados clínicos de *M. tuberculosis* com mutações no genes *rpsL*, *rrs*, *gidB* and *rpoB*

Autores: Fernanda S. Spies, Andrea Von Groll, Andrezza W. Ribeiro, Daniela F. Ramos, Marta O. Ribeiro, Anandi Martin, Juan Carlos Palomino, Maria Lucia R. Rossetti, Pedro Eduardo A. da Silva and Arnaldo Zaha.

Artigo em preparação para ser submetido à publicação no periódico BMC Microbiology.

RESUMO

Problemática: Em geral, é frequentemente assumido que cepas resistentes as drogas pagam um preço fisiológico pela aquisição da resistência. Para estudar o *fitness*, 78 cepas de *M. tuberculosis* de pacientes do sul do Brasil dos anos de 2005-2006 foram selecionadas. As cepas são de diferentes linhagens, diferentes fenótipos de resistência e diferentes genótipos com mutações nos genes *rpsL*, *rrs*, *gidB* e *rpoB*. Foram avaliados mais de uma condição: a curva de crescimento e o crescimento em competição.

Resultados: As cepas com a mutação K43R em *rpsL* cresceram sem diferença da cepa sensível e as cepas com a mutação S531L em *rpoB* cresceram mais rapidamente do que as cepas sensíveis na fase logarítmica. Nos ensaios de competição, nenhuma cepa parental competiu, a competição foi realizada entre as cepas estudadas e, neste caso sempre a cepa sensível teve um melhor *fitness*. Também foi estudado as diferentes linhagens, e de acordo com curvas de crescimento, as cepas LAM cresceram mais lentamente do que as não-LAM na fase lag, mas a diferença no índice de crescimento não foi estatisticamente significativa. Durante as competições as cepas não-LAM tiveram mais CFU do que as cepas LAM, assim cepas LAM poderiam ser mais frequentes em virtude da adaptação a população brasileira e não por este genótipo conferir uma vantagem sobre o crescimento de outros genótipos.

Conclusão: Os resultados sugerem que a heterogeneidade no *fitness* é em função da mutação que gera resistência aos antimicrobianos e também do *background* genético da cepa. Nas cepas clínicas, houve uma pressão seletiva para mutações que conferem resistência as drogas que causam diminuições mínimas no *fitness*.

Fitness in *Mycobacterium tuberculosis* with mutations in the *rpsL*, *rrs*, *gidB* and *rpoB* genes

Fernanda S. Spies^{1,2}, Andrea Von Groll⁴, Andrezza W. Ribeiro², Daniela F. Ramos⁴, Marta O. Ribeiro², Anandi Martin³, Juan Carlos Palomino³, Maria Lucia R. Rossetti², Pedro Eduardo A. da Silva⁴ and Arnaldo Zaha^{1,5*}

¹Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS - Porto Alegre, Brazil;

³Institute of Tropical Medicine - ITM - Antwerp, Belgium

⁴Universidade Federal do Rio Grande - FURG - Rio Grande, Brazil

⁵Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Abstract

Background: In general it is often assumed that drug-resistant strains pay a physiological price for the acquisition of resistance. In order to study the fitness, 78 *M. tuberculosis* strains from southern Brazilian patients from 2005-2006 were selected. The strains are from different lineages, different resistance phenotypes and genotypes with different mutations in the *rpsL*, *rrs*, *gidB* and *rpoB* genes. We evaluated more than one condition, corresponding to the growth curve, and the growth in competition.

Results: The strains mutated in *rpsL* K43R grew with no difference from the susceptible strains and the strains mutated in *rpoB* S531L grew faster than the susceptible strains in the logarithmic phase. In our competitions assays, no parental strains competed, the competition was made between the studied strains and in this case always the susceptible strain had a better fitness. We also studied the different lineages, and according to growth curves the LAM strains grew slower than the non-LAM in the lag phase but the difference in the growth index was not statistically significant. During the competitions the non-LAM strains had more CFU than the LAM strains, thus LAM strains could be more frequent because of adaptation to Brazilian population and not because this genotype would confer an advantage over growth of other genotypes.

Conclusion: Our results suggest that heterogeneity in fitness is in function of the drug-resistance mutation and the strain genetic background. In clinical settings, there was a

strong selection pressure for drug resistance-conferring mutations that cause minimal fitness defects.

Background

Tuberculosis (TB) is still a serious disease worldwide with impressive numbers. According to World Health Organization (WHO), in 2009, there were an estimated of 9.4 million incident cases of tuberculosis (TB) (equivalent to 137 cases per 100,000 population) and an estimated 440,000 cases of multi-drug resistant TB (MDR-TB), which is resistant to the front-line drugs isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) [1]. By March 2011, 69 countries and territories, including Brazil, had reported at least one case of extensively drug-resistant TB (XDR-TB), which is a MDR-TB with additional resistance to fluoroquinolones and at least one of the second-line injectable drugs (amikacin, kanamycin and/or capreomycin) [2]. In Brazil the incidence of tuberculosis was 87 cases per 100,000 population and 72,000 new cases reported. This country is in between the 22 high burden countries where 81% of the TB cases occur [1].

RIF is a widely used first-line antimycobacterial agent and acts by binding to bacterial RNA polymerase and disrupting RNA synthesis. Clinical resistance to this agent results from mutations in the *rpoB* gene, which encodes the β -subunit of the bacterial RNA polymerase [3]. Like other aminoglycosides, streptomycin (STR) acts at the ribosome to interrupt bacterial protein synthesis. Resistance to streptomycin is due mainly to mutations in the ribosomal protein gene *rpsL* and in the ribosomal RNA gene *rrs* [4]. More recently mutations in the *gidB* gene have been described as related with STR-resistance [5,6].

Once a mutation that potentially might render an antibiotic resistance phenotype has occurred, the bacterium carrying the mutated allele must compete with the wild-type ancestor bacterial population. The outcome of the competition process depends on its relative fitness, defined as the efficiency of multiplication of the mutant cell compared with that of the wild-type ancestor population [7]. In general it is often assumed that drug-resistant strains can pay a physiological cost for the acquisition of resistance [8]. The costs of drug resistance are among the most important factors determining both the rate and extent of resistance emergence [9].

The laboratory approaches to estimating the fitness of drug resistant TB include measurement of growth rates, infectivity in animal models, and ability to withstand

specific challenges [10]. The costs of resistance are usually measured relative to the corresponding wild-type fitness in the absence of antibiotics, when the resistant bacteria have to compete with susceptible counterparts [9].

Genotyping of the strains is important to understanding the diversity of bacterial pathogens both for epidemiological and biological reasons [11]. Recent studies have suggested that there are at least six main strain lineages of *M. tuberculosis* associated with particular geographic regions that have co-evolved with and adapted to distinct human populations [12]. These lineages may have shaped and selected different genetic polymorphisms associated with host resistance in specific human populations [13]. In South America, about 50% of the strains belong to the Latin-American-Mediterranean (LAM) lineage [14]. In addition, the variable genetic background of strains belonging to different strain lineages could play a role in the fitness of *M. tuberculosis* [15-16].

In this study we have evaluated the fitness of drug-susceptible and resistant *M. tuberculosis* strains from Brazilian patients. Fitness was determined by different methods that assess the competitive growth capacity of the strains and evaluate differences in the growth curves obtained with the MGIT960 system.

Methods

Strains

Seventy-eight *M. tuberculosis* strains from different lineages and different mutations in the *rpsL*, *rrs*, *gidB* and *rpoB* genes were selected from a collection of clinical isolates from LACEN-RS (Central Laboratory of Rio Grande do Sul State) southern Brazilian patients from 2005-2006. The *M. tuberculosis* strains with the respective resistance profile and gene mutations are shown in the Table 1.

MIC determination

The resazurin microtiter assay (REMA) was used for MIC determination [17] of STR (125 µg/ml to 0.12 µg/ml), RIF (16 µg/ml to 0.03 µg/ml), and INH (12.8 µg/ml to 0.01 µg/ml). The breakpoint used to determine STR resistance was an MIC of ≥ 1 µg/ml and ≥ 0.25 µg/ml for RIF and INH resistance [18]. The MDR strains were tested for three second line drugs ofloxacin (OFL) 8-0.25 µg/ml, kanamycin (KAN) 20-0.62 µg/ml, and capreomycin

(CAP) 10-0.3 µg/ml, the breakpoint to this drugs, respectively was: 2 µg/ml; 2.5 µg/ml and 2.5 µg/ml [19].

Table 1. Genotypic and phenotypic profiles and results of growth parameters.

strain no.	performed tests ^a	resistance ^b	mutation ^c		growth parameters in hours	
			<i>rpsL/rrs/gidB/rpoB</i>	spoligotyping ^d	75 GU	10000-5000 GU
500193	Re	susceptible	-	non-LAM	125	25
500201	D C	R H S	K43R/-/-/-	T5_MAD2	165	20
500251		susceptible	-	H3	144	34
500270		susceptible	-	LAM1	142	29
500281		R H S	-/513 C-T/-/S531L	LAM5	134	17
500294	D	R H S	K43R/-/-/-	LAM	162	35
500425	D	R HS	-/513 C-T/-/S531L	H1	158	18
521015		susceptible	-	LAM1	143	18
521068		H S	-/513C-T/-/H526L	LAM9	157	34
521099		susceptible	-	LAM1	125	22
521108	Re	susceptible	-	H3	131	23
521121	D	S	K43R/-/-/-	H3	139	26
521144		R H S	-/-/-/S531L	LAM5	146	40
521156		susceptible	-	T1	141	24
600007		R H	-/-/-/S531L	LAM9	159	30
600029	D	R H K	-/-/-/H526D	LAM2	255	26
600031	Re	susceptible	-	T1	127	25
600064		R H	-/-/-/S531L	LAM2	126	17
600066		R H S K	-/-/P84L/S531L	LAM4	121	26
600074		R H	-/-/-/S531L	LAM5	162	12
600082		S	-/-/G117E/-	LAM9	161	25
600146	D C	S	K43R/-/-/-	LAM	171	14
600195		susceptible	-	T1	137	25
600254		susceptible	-	T1	121	25
600305	D	R H S	-/-/H48Y/D516V	T1	144	25
600313	D	R H	-/-/-/S531W	LAM9	250	36
600339		R H S	K43R/-/-/Q510H and H526Y	LAM6	234	52
600356	C	R H	-/-/-/L533P	LAM2	153	39
600382		R H	-/-/-/S531L	LAM2	148	21
600484	D	R H S K	-/-/A200E/H526D	LAM	153	42
600525		R H K	-/-/-/S531L	LAM4	125	25
600599		R H K	-/-/-/S531L	LAM9	157	19

600726		R H S	-/-/S531L	LAM5	157	26
600730		S	-/-/39 frameshift (delC115)/-	non-LAM	144	26
600772		susceptible	-	LAM1	167	53
600793	D	R H	-/-/S531L	non-LAM	156	28
600807		R H S	-/-/W45S/-	LAM1	215	34
600811		R H K	-/-/H526Y	LAM2	141	35
600813		susceptible	-	T2	110	27
600853		R H	-/-/34 frameshift (delG100)/H526L	non-LAM	135	31
600878	Re	susceptible	-	H3	130	22
600954	Re	susceptible	-	T3	134	20
600957		S	wt	LAM9	153	26
621001		R H S	-/-/H526D	LAM3	164	33
621002		S	wt	H3	153	25
621009		susceptible	-	LAM3	120	24
621023		susceptible	-	non-LAM	215	31
621031		S	-/-/L49P/-	H3	172	20
621036		susceptible	-	H3	120	25
621042	Re C	susceptible	-	T3	122	30
621044		R H	-/-/S531L	LAM5	124	15
621047		R H S K	L81L/905A-G/117 frameshift (insG350) /H526Y	H3	147	30
621049	D C	R H	-/-/S531L	LAM5	113	18
621052		R H S	K43L/-/-/S531L	T5_MAD2	147	17
621058	D C	R H S	-/-/H526Y	LAM9	161	24
621078	D	R H	-/-/S531L	LAM5	138	14
621087	D	R H	-/-/ins516	LAM	200	25
621108		S	-/-/G164C/-	T1	136	22
621109		H	wt	LAM2	140	27
621113	Re C	susceptible	-	LAM2	127	37
621115		R H S O K	K43R/-/-/H526R	T5_MAD2	153	32
621118		R H K	-/-/D516Y	LAM	133	27
621137		H S	wt	LAM3	135	34
621161	D	R H S	K88R/-/A183T/ S531L	LAM5	388	81
621164		R H	-/-/S531L	LAM5	120	18
621169	D C	R H K	-/-/H526D	T1	153	26
621170	Re	S	-/-/L79F/-	LAM9	121	27
621172	C	R H S K	K43R/-/-/H526Y	T5_MAD2	133	24

621173	D C	R H S K	K43R/-/-/S531L	LAM6	199	71
621192		R H	-/-/-/H526P	non-LAM	149	37
621201		R H	-/-/-/H526Y	LAM9	169	35
621202		R H S	-/-/-/S531L	LAM9	181	25
621204		susceptible	-	non-LAM	161	30
621206	D	R H	-/-/-/H526D	H1	158	29
621220		R H	-/-/P84L/ S531L	LAM4	155	25
621226	D	R H	-/-/-/Q513E	LAM1	216	57
621239		S	wt	LAM9	133	24
6001061		R H	-/-/S100F/S531L	LAM5	144	14

^aRe-reproducibility, D-with drugs, C-competition. ^bR- rifampicin, H- isoniazid, S- streptomycin, O- ofloxacin, K-kanamycin. ^cwt- wild type – gene without mutation, *rpsL* - AAG→AGG, K43R; CTG→TTG, L81L; AAG→AGG, K88R. *rrs* - 513 C-T; 905A-G. *gidB*- 39 frameshift (delC115); 34 frameshift (delG100); TGG→TCG, W45S; CAT→TAT, H48Y; CTA→CCA, L49P; TTG→TTT, L79F; CCG→CTG, P84L; TCT→TTT, S100F; 117 frameshift (insG350); GGG→GAG, G117E; GGC→TGC, G164C; GCG→ACG, A183T; GCG→GAG, A200E. *rpoB* - CAG→CAC, Q510H; CAA→GAA, Q513E; GAC→TAC, D516Y; GAC→GTC, D516V; ins 516 CCAGAACAACCC; CAC→CTC, H526L; CAC→GAC, H526D; CAC→TAC, H526Y; CAC→CGC, H526R; CAC→CCC, H526P; TCG→TTG, S531L; TCG→TGG, S531W; CTG→CCG, L533P. ^dLAM- Latin America Mediterranean, H-Haarlem.

Sequencing

DNA was isolated from mycobacterial cultures by a lysozyme/proteinase K cetyltrimethylammonium bromide procedure [20]. A 306-bp fragment of the *M. tuberculosis rpsL* gene [GenBank: L08011] and the 530 (238 bp) and 912 region (238 bp) of the *rrs* gene [GenBank: X52917] were amplified as described by Tracevska et al. [21], a 675-bp fragment of the gene *gidB* [GeneBank: AAK48404] was amplified as described by Spies et al. [6], and the hot spot fragment of the *rpoB* gene was amplified as described in Telenti et al. [3] [GeneBank: AY787173]. Amplification products were sequenced using the ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems) and MegaBACE 1000 DNA analysis system (GE Healthcare Life Sciences). Nucleotide sequences were analyzed using the programs PREGAP and GAP4 of the STADEN software package ver. 10.0. Nucleotide sequences with Phred values >20 were considered for analysis.

Genotyping

Spoligotyping was performed using a commercial kit, according to the manufacturer instructions (Isogen Biosciences B.V., The Netherlands). The Shared International Types (SITs) and lineages were identified according to the SpolDB4 [14]. The strains were further characterized by a LAM-specific PCR to classify strains that could not be assigned

to an internationally recognized genotype lineage by spoligotyping. In this assay, PCR primers identify the presence of an *IS6110* insertion (position 932204 according to the whole H37Rv genome sequence), which is unique to all members of the LAM lineage [22]. PCR amplification products were electrophoretically fractionated and the presence of a LAM strain was represented by a band of 205 base pairs, while a non-LAM strain was represented by a band of 141 base pairs [22].

Growth curve in MGIT

From a fresh subculture on Löwestein Jensen (LJ) medium with 21 days, the inoculum was done with the McFarland tube No. 1 and the turbidity was measured in 492 nm spectrophotometer (Biotrak II Visible Plate) and adjusted the turbidity of 0.15-0.17. After was done the dilution 1:20. From this tube was added 100 µl of inoculum in 3 different BBL MGIT tubes (Becton Dickinson, USA). The tubes were maintained at 37 °C in the MGIT™ automated system. The system monitors the increase of fluorescence and report as growth units (GU) to the BD EpiCenter™ software every hour. As in Toungousova et al. [15] a reproducibility test was done. Eight different susceptible strains were subcultured in two different days and the growth curve was done in two different days and in three different MGIT tubes in the same day. After this test, all the other strains tested were made in three different tubes in the same day.

The parameters used to compare the growth curves were: the length of the lag phase that was the time in hours when a strain reach the growth level of 75 growth units (GU) in the MGIT system (also the positive threshold); and the growth index, that was the time in hours necessary for a strain to increase from 5,000 to 10,000 GU in the MGIT system [23]. The statistical analysis was made in SPSS version 16 and the non-parametric Mann Whitney test was used, a p value of <0.05 was considered significant.

Competition between susceptible and resistant strains (LAM x LAM and non-LAM x non-LAM)

In this experiment susceptible and resistant strains with the same genotype lineage competed in a common environment. The LAM genotype susceptible strain 621113 competed with five LAM mutated resistant strains: 600146 (K43R), 621049 (S531L), 621173 (K43R/S531L), 621058 (H526Y), and 600356 (L533P). The susceptible non-LAM

strain 621042 competed with three non-LAM mutated resistant strains: 500201 (K43R), 621169 (H526D), and 621172 (K43R/H526Y). The inoculum was done as described before, but the dilution was 1:10 in autoclaved water, and serial 1:10 dilutions were done six times. To estimate the colony forming units (CFU) the Miles and Misra [24] technique was applied. 50 μ l of the dilutions 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} in 7H11-agar plates without drugs were kept in the incubator for 30 days until the readings. The first dilution 1:10 of each strain was put in tubes with 7H9 plus OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase) and 0,05% tween medium, the same was done with two inoculums together (competition). 17 days later another serial 1:10 dilution was done with the tubes of the competition and the strains growing alone, to estimate the CFU, plates of the dilutions 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} in 7H11 with and without drugs were made. The strains with *rpoB* mutation were subcultured in RIF plates (2 μ g/ml), and strains with *rpsL* mutation in STR plates (5 μ g/ml), strains with mutations in these two genes were subcultured in the two separated drug-plates and kept in the incubator for 30 days until the counter of CFU.

Competition between resistant and mutated *rpoB* and *rpsL* strains (LAM x non-LAM)

In this experiment two resistant strains with different genotype competed in a common environment. Three competitions between LAM and non-LAM strains with mutation in the same gene were done: mutated in *rpsL* K43R (strains: 500201-non-LAM and 600146-LAM); mutated in *rpoB* H526 (strains: 621169-non-LAM and 621058-LAM); and mutated in *rpsL* and *rpoB* (strains: 621172-non-LAM (K43R/H526Y) and 621173-LAM (K43R/S531L)). As the strains had the same resistance it was not possible to separate the strains after the competition in plates with or without drugs. In order to do the counting, each colony that grew after the competition in the 7H11 plates without drugs were took with a loop and put in tubes with 7H9 plus OADC during 15 days to have more bacteria to extract the DNA. With the DNA extracted [20] a PCR using the primers to differentiate between LAM and non-LAM lineages was done in all colonies separately as described above [22].

Results

Reproducibility test

In order to show the reproducibility, growth curves were done with eight different susceptible strains that were tested in two different days and in three tubes each day. The average of the length of the lag phase (time in hours when a strain reaches the growth level of 75 units in the MGIT system) and the growth index (time in hours necessary for a strain to increase from 5,000 to 10,000 GU in the MGIT system) are shown in Figure 1. For the growth index the average of all strains for the first day was 26.6 hours and for the second day was 27.6 hours. According to non-parametrical Mann Whitney test, these results showed no significant difference ($p=0.878$). For the length of the lag phase we had the average for the first experiment as 139.5 h and for the second 140.4 h, again the statistical test showed no difference between the measurements performed during the two experiments ($p=0.958$).

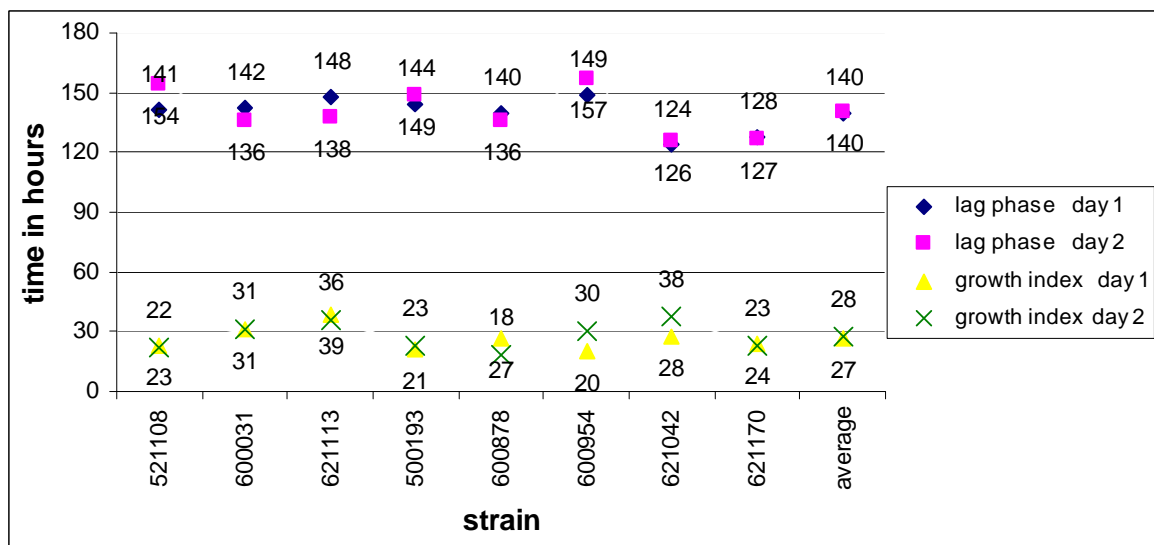


Figure 1. The length of the lag phase and the growth index for the reproducibility test made with eight strains in two different days (day 1 and 2), for both parameters the statistical test showed no different between the measurements performed during the two experiments ($p=0.958$ and 0.878 , respectively).

Study of fitness by growth curves

The length of the lag phase and growth index for all strains studied are listed in Table 1. Table 2 shows the comparison between susceptible strains with mutated strains. There were 20 susceptible strains studied and the average length of the lag phase for this

group was 137 hours, eight strains with mutations in *rpoB* H526 (169 h; 4 H526D, 3 H526Y, and 1 H526P), five *rpoB* rare, single strains with one of the following mutations: S531W, L533P, ins516, D516Y, Q513E (190 h), four strains with mutations in *rpsL* K43R (159 h), 16 strains with mutations in more than one gene, two strains with mutations in K43R/S531L, other two with mutations in S531L/513 C-T, and the other strains with one of the following mutations: K43R/H526Y; K43R/H526R; K43R/Q510H/H526Y; L81L/117 frame shift (insG350)/905A-G/H526Y; K88R/S531L/ A183T; S531L/P84L; S531L/S100F; S531L/P84L; D516V/H48Y; H526D/A200E; H526L/34 frame shift (delG100); H526L/513C-T (169 h). The comparison between susceptible strains and the strains described above had a p value statistically significant, respectively (0.002, 0.010, 0.029, and 0.004).

The comparisons 5, 6 and 7 between susceptible and mutated in *gidB* (6 strains) with one of the following mutations: W45S; L49P; L79F; 39 frame shift (delC115); G117E; and G164C; in *rpoB* S531L (14 strains) and wild type (wt, 5 strains resistant by MIC but without mutations in the studied genes), had the length of the lag phase reached in 158, 144 and 143 h, respectively, having a p value not statistically significant (0.095, 0.259 and 0.192, respectively). The mutations found in *rpsL*, *rrs*, *gidB* and *rpoB* are described in Table 1.

The strains were also analyzed for the length of the lag phase according to the genotype lineage, LAM (47 strains) needs 162 h and non-LAM (31 strains; 10 Haarlem, 14 T and 7 non-LAM) needs 144 h to reach 75 growth units (GU) (p=0.090).

The same comparisons were done with the growth index and the average for the susceptible strains was 27 hours, for strains mutated in *rpoB* H526 was 31 h, strains mutated in *rpoB* rare was 37 h, strains mutated in *rpsL* 24 h, strains with mutations in more than one gene 34 h, strains with mutation in *gidB* 26 h, strains mutated in *rpoB* S531L 22 h, and wt strains 27 h.

In the comparisons 3 (between susceptible and mutated in *rpsL*; p=0.525), 4 (susceptible and mutated in more than one gene; p=0.498), 5 (susceptible and mutated in *gidB*; p=0.836), 7 (susceptible and wt; p=0.621) and 8 (LAM and non-LAM; p=0.395) the difference was not statistically significant. In the comparisons 1 (susceptible and mutated in *rpoB* H526; p=0.079) and 2 (susceptible and *rpoB* rare; p=0.051) the p value is in border-line. Only the comparison 6 (between susceptible and mutated in *rpoB*S531;

p=0.043) had a p value statistically significant, and in this case the mutated strains reach the 10,000 GU in less hours than the average for the susceptible strains, the opposite of what is happening with all the other strains, where the susceptible strains usually grew faster and reach the GU indicated in less hours (see averages in Table 2).

Table 2. Comparisons between susceptible strains with different mutated strains and between different lineages.

comparison	mutation	no.	length of the lag phase			growth index		
			average	st. Deviation	p value	average	st. Deviation	p value
1	susceptible	20	137	23		27	8	
	H526D/P/Y	8	169	36	0.002	31	5	0.079
2	susceptible	20	137	23		27	8	
	<i>rpoB</i> rare	5	190	47	0.010	37	13	0.051
3	susceptible	20	137	23		27	8	
	K43R	4	159	14	0.029	24	9	0.525
4	susceptible	20	137	23		27	8	
	more than one gene	16	169	64	0.004	34	19	0.498
5	susceptible	20	137	23		27	8	
	<i>gidB</i>	6	158	33	0.095	26	5	0.836
6	susceptible	20	137	23		27	8	
	S531L	14	144	20	0.259	22	8	0.043*
7	susceptible	20	137	23		27	8	
	wt	5	143	10	0.192	27	4	0.621
8	LAM	47	162	48		30	14	
	non-LAM	31	144	20	0.090	26	5	0.395

* the *rpoB* S531L strains reaches the 10,000 GU in less hours than the average for the susceptible strains. In the other statistical significant P value the average for the susceptible strains reaches the 10,000 GU in less hours.

Competitions

In the LAM strains competition, the susceptible strain competed with five mutated strains. All strains grew well before the test and during the competition in an alone tube. In the competition tube the susceptible strain grew better in all competitions (the susceptible strains always started the competition with less CFU than the mutated strains and finished always with more) and in the competition between susceptible and mutated in *rpoB* but not in codon 531 (H526Y and L533P) no CFU after the competition was visualized in the dilution of 10^{-4} (Table 3).

In the non-LAM strains competition, the susceptible strain competed with three mutated strains. The competition with *rpsL* K43R strain could not be analyzed because this

strain did not grow even before the test. In the other two competitions, both strains grew

Table 3 – Results of the competitions between LAM strains. The dilution 10^{-4} was used for CFU counting.

Strain	genotype	mutation	before competition		after competition			
			CFU/ml ($\times 10^4$)	%*	CFU/ml ($\times 10^5$)	%*	CFU/ml ($\times 10^5$)	%
621113	LAM2	susceptible	10	2.0	12	28.6	40	83.3
600146	LAM	K43R	492	98.0	30	71.4	8	16.7
621113	LAM2	susceptible	10	2.4	12	10.9	54	75.0
621049	LAM5	S531L	400	97.6	98	89.1	18	25.0
621113	LAM2	susceptible	10	4.7	12	40.0	40	88.9
621173	LAM6	K43R/S531L	202	95.3	18	60.0	5	11.1
621113	LAM2	susceptible	10	13.2	12	85.7	18	100.0
621058	LAM9	H526Y	66	86.8	2	14.3	0	0.0
621113	LAM2	susceptible	10	12.2	12	46.2	18	100.0
600356	LAM2	L533P	72	87.8	14	53.8	0	0.0

* One tube related to the other, when the sum of both tubes is made and corresponds to 100%.

well before and in the alone tube, but in the competition tube the susceptible strain grew better than the mutated strain (Table 4). However, in the competition between the strain with mutation in *rpsL* and *rpoB* (621172) and the susceptible strains, both strains showed a similar growth behavior.

Table 4 – Results of the competitions between non-LAM strains. The dilution 10^{-4} was used for CFU counting.

Strain	genotype	mutation	before competition		after competition			
			CFU/ml ($\times 10^4$)	%*	CFU/ml ($\times 10^5$)	%*	CFU/ml ($\times 10^5$)	%
621042	T3	susceptible	46	100.0	58	100.0	38	100.0
500201	T5_MAD2	K43R	0	0.0	0	0.0	0	0.0
621042	T3	susceptible	46	67.6	58	74.4	78	97.5
621169	T1	H526D	22	32.4	20	25.6	2	2.5
621042	T3	susceptible	46	51.1	58	34.1	96	56.1
621172	T5_MAD2	K43R/H526Y	44	48.9	112	65.9	75	43.9

* One tube related to the other, when the sum of both tubes is made and corresponds to 100%.

And in the LAM x non-LAM competition, again the first experiment could not be analyzed because the strain 500201 did not grow before the test. In the other competition, the non-LAM strain (T lineage) had an advantage and grew better in competition with LAM strains (Table 5).

Table 5 – Results of the competitions between non-LAM and LAM resistant and mutated strains. The dilution 10^{-4} was used for CFU counting.

Strain	genotype	mutation	before competition		after competition			
			CFU/ml ($\times 10^4$)	%*	CFU/ml ($\times 10^5$)	%*	CFU/ml ($\times 10^5$)	%*
600146	LAM	K43R	492	100.0	30	100.0	8	100.0
500201	T5_MAD2	K43R	0	0.0	0	0.0	0	0.0
621058	LAM9	H526Y	66	75.0	2	9.1	2	11.1
621169	T1	H526D	22	25.0	20	90.9	16	88.9
621173	LAM6	K43R/S531L	202	82.1	18	13.8	0	0.0
621172	T5_MAD2	K43R/H526Y	44	17.9	112	86.2	48	100.0

* One tube related to the other, when the sum of both tubes is made and corresponds to 100%.

Discussion

Mycobacterial populations are composed of a mixture of different genotypes with different susceptibility to anti-TB drugs, various metabolic rates and fitness characteristics, resulting in more or less successful dissemination of particular genotypes and mutations-conferring resistance. Variation in the fitness of drug-resistant strains may have significant impact on the future of the MDR and XDR epidemics, proposed by mathematical models [25].

To analyze the growth of *M. tuberculosis* strains, one of the methods used was the MGIT system and to prove that this is a reproducible method [15], growth curves of different susceptible strains in two different days were compared, showing concordant results. Using this method it was possible to analyze the growth curves of 78 southern Brazilian strains and infer about the fitness of the mutation-conferring resistance studied.

The growth curves of four strains presenting the mutation *rpsL* K43R, the most frequent mutation in clinical STR-resistant samples [26-27], was analyzed. These strains grew with no difference from the susceptible strains in the logarithmic phase (growth

index). Experimental studies in *M. smegmatis* have shown that the mutation in *rpsL* K43R is a non-cost resistance mutation which does not affect fitness and that the growth of this mutant was similar to that of the wild type [28]. However, in our study, in the competition assay the susceptible strain had a better growth than the mutated in K43R strain.

Drug resistant strains were phenotypically and genotypically heterogeneous and *M. tuberculosis* strains showed significant differences in the parameters studied depending on the type of mutation in *rpoB* gene. In the strains mutated in *rpoB* gene we had two different groups, the strains presenting the *rpoB* S531L mutation, and the strains mutated in *rpoB* but not in S531L. The *rpoB* S531L mutated strains did not show difference from the susceptible strains in the lag phase and they grew faster than the susceptible strains in the logarithmic phase. However, strains presenting mutations other than S531L grew slower than the susceptible strains in the two parameters studied. This result confirmed previous studies showing that the mutation S531L *rpoB* seems to not have biological cost to the growth of *M. tuberculosis* [15, 29].

In the competition experiments, we selected one strain from each group for the competition study. The susceptible strains grew better in all competitions, and strains with the mutation *rpoB* S531L were again better than the strains with mutations other than S531L. Studies on fitness of spontaneous RIF-resistant strains in competition showed that the mean fitness of most of the resistant strains tested was lower than that of the susceptible parent [8, 30]. These studies suggested that mutations in *rpoB* results in a physiological cost and that the strain mutated in *rpoB* S531L had the smallest fitness deficit, since this is the most frequent mutation identified in clinical strains, this would suggest that mutants isolated more frequently in clinical practice have a higher mean relative fitness on initial isolation [8]. Differently from other studies, in our competitions assays, no parental strains competed, the competition was made between the strains spread among Brazilian patients between 2005-2006 years, and in this case, always the susceptible strains had a better fitness.

The growth of strains with mutation in more than one gene was slower in the length of the lag phase, but the growth index showed no difference from the susceptible strains. In the competition assay, the LAM strains did not grow well but the non-LAM strains grew almost the same as the susceptible strain. Davies et al. [31] reported a case of two patients with the same RFLP pattern, one developed MDR-TB disease, the strains competed in a

common environment and the MDR isolate showed decreased fitness compared to the susceptible isolate, this was the first demonstration that clinical isolates pay a physiological price for the development of MDR, however the virulence of MDR strain *in vivo* was sufficient to cause progressive deterioration in lung function.

The only XDR strain found in this study showed slower growth than the average for the susceptible strains in the parameters the length of the lag phase and growth index. The 11 pre-XDR strains (Table 1), that is in this case a MDR strain resistant to kanamicin and susceptible to fluoroquinolones [32], also had a slower growth when comparing the same parameters above with the susceptible strains (average for the 11 strains: 156 h and 32 h, respectively). At a minimum, XDR strains have mutations in at least four genes that encode key enzymes, which collectively could impact the growth physiology of XDR strains. In fact, many of these XDR strains are resistant to many more drugs, with each additional drug resistance-conferring mutation potentially adding to the fitness burden. It is interesting to speculate that although compensatory evolution might be able to mitigate the deleterious effects of a few drug-resistant mutations, there might be a limit for the degree to which the fitness defects of highly resistant XDR strains might be compensated [25].

We also studied strains with different genotypes, since the LAM lineage is the most frequent lineage among Brazilian strains [14,33] and we had, in this study, 60% of LAM lineage strains and 40% of other lineages, we analyzed if Brazilian-LAM-lineage strains had an advantage in growth over non-LAM strains. In the growth curves, analyzing the average of the length of the lag phase and the growth index for the LAM strains, they grew slower than the non-LAM strains, but the statistical analysis showed that the p value for the lag phase was in the border-line and the difference in the growth index was not statistically significant. One factor that could be influencing the difference between LAM and non-LAM strains is the diverse presence of mutations in the genes analyzed and the number of susceptible strains in each group, LAM strains had 6/47 (13%) of susceptible strains and non-LAM had 14/31 (45%). This present study showed different results from a previous study that also used Brazilian samples, where LAM strains had a significantly faster growth compared with non-LAM strains, when susceptible strain were analyzed and only one (1/40) MDR strain was included [16]. During the competitions the non-LAM strains had more CFUs than the LAM strains (with mutations in the same genes) corroborating with the fact that they grew faster in this study. However, the results of this assays do not

explain why LAM lineage is the most frequent lineage in Brazil. Recent studies have suggested that there are main lineages of *M. tuberculosis* that co-evolved with and adapted to distinct human populations [13], thus LAM strains could be more frequent because of adaptation to Brazilian population and not because this genotype would confer an advantage over growth of other genotypes.

Furthermore, although drug-resistant strains often suffer an initial reduction in fitness, they could continue to evolve by acquiring one or more secondary-site mutations that can improve or even restore the fitness of these strains over time, a process known as compensatory evolution [25]. Experiments in other models suggest that such fitness deficits can be reduced by compensating mutations arising at other sites after further growth [8]. As our samples are from patients, mutations that compensate initial loss in fitness may have occurred and they were not evaluated.

Conclusion

Our study compared strains with different genetic backgrounds and also different phenotypes with respect to RIF, INH, STR, OFL and KAN resistance and genotypes with respect to *rpsL*, *rrs*, *gidB* and *rpoB* mutations, different combination of mutations were studied. We evaluated more than one condition, corresponding to the capacity to grow alone, and to grow in competition. Our results suggest that heterogeneity in fitness is function of the drug-resistance mutation, the strain genetic background, and potentially compensatory evolution as well. In clinical settings, there was a strong selection pressure for drug resistance-conferring mutations that cause minimal fitness defects, since strains with *rpoB* S531L mutation, which is the most frequently found in clinical RIF-resistant isolates, grew faster than susceptible strains and the *rpsL* K43R mutation, which is the most frequently found in clinical STR-resistant strains, grew without difference. On the other hand, strains with mutations in *rpoB* in codon rarely related with clinical RIF-resistance grew slower than the susceptible ones. However, as clinical isolates of *M. tuberculosis* were studied and since the genetic backgrounds of the organisms in this study are different and unknown the results must therefore be interpreted with caution.

References

1. WHO: **Global tuberculosis control**. 2010.

2. WHO: **Tuberculosis MDR-TB e XDR-TB 2011 progress report**. 2011
3. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T: **Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis***. *Lancet* 1993, **341**:647–650.
4. Finken M, Krischner P, Meier A, Wrede A, Bottger EC: **Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot**. *Mol Microbiol* 1993, **9**:1239-1246.
5. Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y, Tokuyama S, Suzuki Y, Ochi K: **Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria**. *Mol Microbiol* 2007, **63**:1096-1106.
6. Spies FS, da Silva PEA, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A: **Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism**. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:2947-2949.
7. Martinez JL, Baquero F: **Mutation frequencies and antibiotic resistance**. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**:1771-1777.
8. Billington OJ, McHugh TD, Gillespie SH: **Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis***. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:1866–1869.
9. Schulz zur Wiesch P, Engelstadter J, Bonhoeffer S: **Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations**. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**:2085–2095.
10. Cohen T, Sommers B, Murray M: **The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis***. *Lancet Infect Dis* 2003, **3**: 13–21.
11. Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S: **Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies**. *PLoS ONE* 2009, **4**:e7815.
12. Gagneux S, Small PM: **Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development**. *Lancet Infect Dis* 2007, **7**: 328–337.
13. Gagneux S, DeRiemer K, Vanb T, Kato-Maedab M, de Jong BC, Narayanang S, Nicolh M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewelle PC, Small PM: **Variable host–pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis***. *PNAS* 2006, **103**: 2869-2873.
14. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeyer C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, de Viedma DG, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Guttierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ly HM, Martin C, Martin C, Mokrousov I, Narvskaja O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofa-Razanamparany V, Rasolonalavona T, Rossetti ML, Rüsich-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A,

- Skuce RA, van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C: ***Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology.** *BMC Microbiol* 2006, **6**:23.
15. Toungousova OS, Caugant DA, Sandven P, Mariandyshev AO, Bjune G. **Impact of drug resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing genotype.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004, **42**: 281–290
 16. von Groll A, Martin A, Felix C, Sanmartin Prata PF, Honscha G, Portaels F, Vandame P, da Silva PEA, Palomino JC: **Fitness study of the RD^{Rio} lineage and Latin American Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010, **58**:119–127.
 17. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F: **Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**:2720-2722.
 18. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC: **Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*.** *J Antimicrob Chemother* 2005, **55**:500-505.
 19. Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC: **Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**: 3616–3619.
 20. van Soolingen D, de Hass PE, Hermans PW, van Embden JD: **DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Methods Enzymol* 1994, **235**:196-205.
 21. Tracevska T, Jansone I, Nodieva A, Marga O, Skenders G, Baumanis V: **Characterisation of *rpsL*, *rrs* and *embB* mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Res Microbiol* 2004, **155**:830-834.
 22. Marais BJ, Victor TC, Hesselning AC, Barnard M, Jordaan A, Brittle W, Reuter H, Beyers N, van Helden PD, Warren RM, Schaaf HR: **Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape province of South Africa.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:3539-3543.
 23. von Groll A, Martin A, Stehr M, Singh M, Portaels F, da Silva PE, Palomino JC: **Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype.** *PLoS One* 2010, **5**:e10191.
 24. Miles AA, Misra SS: **The estimation of the bacteriocidal power of blood.** *J Hyg Camb* 1938, **38**:732-749.
 25. Borrel S, Gagneux S: **Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2009, **13**:1456–1466.

26. Brzostek A, Sajduda A, Sliwinski T, Augustynowicz-Kopec E, Jaworski A, Zowolska Z, Dziadek J: **Molecular characterisation of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2004, **8**:1032-1035.
27. Fukuda M, Koda H, Ohno H, Yang B, Hirakata Y, Maesaki S, Tomono K, Tashiro T, Kohno S: **Relationship between genetic alteration of the *rpsL* gene and streptomycin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan.** *J Antimicrob Chemother* 1999, **43**:281-284.
28. Sander P, Springer B, Prammananan T, Sturmfels A, Kappler M, Pletschette M, Böttger EC: **Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**: 1204–1211.
29. Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohanna B: **The Competitive Cost of Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Science* 2006, **312**:1944-1946.
30. Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE, Andersson DI: **Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:1289–1294.
31. Davies AP, Billington OJ, Bannister BA, Weir WR, McHugh TD, Gillespie SH: **Comparison of fitness of two isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, one of which had developed multi-drug resistance during the course of treatment.** *J Infect* 2000, **41**:184–187.
32. Banerjee R, Allen J, Westenhouse J, Oh P, Elms W, Desmond E, Nitta A, Royce S, Flood J: **Extensively drug-resistant tuberculosis in california, 1993-2006.** *Clin Infect Dis* 2008, **47**:450-7.
33. Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC, Palaci M, Telles MA, Ritacco V, Suffys PN, Lopes ML, Campelo CL, Miranda SS, Kremer K, da Silva PE, Fonseca Lde S, Ho JL, Kritski AL, Rossetti ML: **Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America.** *BMC Microbiol* 2009, **9**:39.

Capítulo 5

Discussão Geral e Perspectivas

DISCUSSÃO GERAL

A resistência genética aos antimicrobianos em *M. tuberculosis* é devido a mutações espontâneas que ocorrem no cromossomo bacteriano, uma vez que nenhum elemento genético móvel foi descrito nessa espécie (Zhang and Yew, 2009). Um grande progresso tem sido feito na compreensão das bases moleculares na ação de diversos antimicrobianos utilizados no tratamento e em seus mecanismos de resistência.

Existem mutações, relacionadas com a resistência, que são mais encontradas em isolados clínicos em diversos estudos, como por exemplo, a mutação K43R em *rpsL* (Fukuda *et al.*, 1999; Brzostek *et al.*, 2004; Spies *et al.*, 2008), a mutação S531L em *rpoB* (De la Iglesia and Morbidoni, 2006, Zhang and Yew, 2009) e a mutação S315T em *katG* (Dalla Costa *et al.*, 2009; Zhang and Yew, 2009), todas essas mutações estão relacionadas com alto nível de resistência respectivamente às drogas STR, RIF e INH. Essas mutações também foram encontradas em maior número de isolados neste estudo, sendo a mutação K43R em *rpsL* encontrada em 10/40 isolados STR-resistentes, a mutação S531L em *rpoB* em 32/64 isolados RIF-resistentes e a mutação S315T em *katG* em 20/21 isolados sequenciados para este gene. No anexo 1 encontra-se uma tabela com o resultado de sequenciamento, MIC e *spoligotyping* para todas as 106 amostras estudadas e de onde alguns isolados foram selecionados para os testes de *fitness* (Capítulos 3 e 4). Cabe salientar que duas mutações não foram levadas em consideração nos estudos de *fitness*, pois elas foram consideradas como não relacionadas com a resistência e, sim, como marcadores filogenéticos, são elas 491 C-T no gene *rrs* (Victor *et al.*, 2001; Victor *et al.*, 2004) e *gidB* L16R (ver Capítulo 2).

Ainda existem antimicrobianos utilizados no tratamento, onde o mecanismo de resistência já foi descrito, mas não totalmente elucidado em todas as cepas resistentes fenotipicamente, como no caso da INH e da STR. O caso da STR foi estudado com mais detalhes nesta tese, pois somente 70% dos isolados resistentes a esta droga apresentam mutações nos genes *rpsL* e *rrs* (Sreevatsan *et al.*, 1997; Riska *et al.*, 2000). No sentido de esclarecer o mecanismo de resistência a STR, um gene foi recentemente descrito como relacionado com o baixo nível de resistência a STR (*gidB*) (Okamoto *et al.*, 2007).

Em nosso estudo foram sequenciados 106 isolados de *M. tuberculosis* e foram encontradas 11/40 (27%) cepas resistentes a STR somente com mutações em *gidB*. Foram

encontrados cinco isolados sensíveis a STR (resistentes a RIF e INH) com mutações nesse gene. Fato semelhante foi encontrado por Okamoto *et al.* (2007), onde mutações em *gidB* em cepas sensíveis a STR ocorreram em 15 de um total de 51 cepas resistentes a RIF e INH e em somente uma 1 de 24 totalmente sensível.

Nesse mesmo estudo foram avaliadas também as mutações encontradas por outros grupos sobre esse gene (Okamoto *et al.*, 2007; Via *et al.*, 2010; Spies *et al.*, 2008; Capítulo 2) e esses estudos juntos analisaram 414 cepas de *M. tuberculosis* do Japão (132), Coréia do Sul (97) e Brasil (185), respectivamente. Esse gene mostrou-se bastante polimórfico, apresentando tanto mutações pontuais quanto mutações que alteram a fase de leitura (deleções e inserções) em pontos variados do gene. Essas mutações são em todos os estudos encontradas em isolados resistentes e sensíveis a STR. Logo, mais isolados deverão ser estudados para que as mutações relacionadas com a resistência a baixo nível a STR sejam identificadas.

Nos estudos citados anteriormente sobre o gene *gidB* foram encontradas duas mutações muito frequentes entre os isolados, CTT→CGT, L16R e GAA→GAC, E92D, elas foram tratadas como um polimorfismo, pois estavam presentes em grande número de isolados resistentes e sensíveis.

Ao estratificar as cepas de acordo com o *spoligotyping* e PCR-LAM específico, esses polimorfismos mostraram-se linhagem específicos, sendo o alelo 16G presente em cepas pertencentes a linhagem LAM e o alelo 92C presente em cepas do genótipo Beijing, essa distribuição está de acordo com a distribuição das linhagens pela base de dados do *spoligotyping* (SpolDB4; Brudey *et al.*, 2006). Logo, o polimorfismo L16R é mais frequente em isolados LAM e também mais observado entre os isolados amostrados do Brasil, pois essa linhagem é bastante frequente nesse país. Por sua vez, o polimorfismo E92D mais frequente entre a linhagem Beijing é, não por coincidência, o polimorfismo mais encontrado entre isolados amostrados na Ásia, local onde a presença de cepas Beijing é maior (Brudey *et al.*, 2006).

A técnica de *spoligotyping*, por sua vez, classifica alguns isolados como linhagem desconhecida (U, *Unknown*) e existem alguns padrões que ainda não foram depositados na base de dados e por isso não foram descritos e identificados. Esses isolados foram encontrados no trabalho e através do polimorfismo L16R puderam ser classificados em

LAM ou não-LAM, demonstrando que a técnica que utiliza SNPs classifica os isolados mais corretamente que a técnica do *spoligotyping*.

Os SNPs atuam como mutações filogeneticamente informativas, pois a baixa variação nas sequências de DNA de *M. tuberculosis* torna a ocorrência de mutações independentes muito improváveis, juntamente com a falta de transmissão horizontal de genes que reduz, ainda mais, a probabilidade da observação de SNPs independentes e recorrentes (Gagneux and Small, 2007). A tipagem molecular pode ser utilizada para aumentar o nosso conhecimento sobre as diferenças na virulência e transmissão e a variação da efetividade das vacinas (Comas *et al.*, 2009), já que algumas linhagens parecem ter características específicas como por exemplo: cepas da linhagem W-Beijing tem sido fortemente associadas com resistência às drogas (Drobniewski *et al.*, 2005; Kubica *et al.*, 2005).

As mutações espontâneas que geram resistência em *M. tuberculosis* ocorrem em baixa frequência e, por isso, o desenvolvimento de bacilos resistentes a três drogas usadas simultaneamente no tratamento, na teoria virtualmente não existe quando três drogas efetivas são usadas em combinação no tratamento da TB (Zhang and Yew, 2009). O mesmo é enfatizado pelo Ministério da Saúde: a TB é uma doença curável em praticamente 100% dos casos novos, sensíveis aos medicamentos anti-TB, desde que obedecidos os princípios básicos da terapia medicamentosa e a adequada operacionalização do tratamento (BRASIL, 2010). Porém, a terapia é muito longa (no mínimo 6 meses) e com vários efeitos adversos. Esses fatores fazem com que muitas pessoas não completem o tratamento corretamente, causando, assim, a seleção de isolados resistentes às drogas. O fato se torna ainda mais grave quando uma pessoa se infecta com uma bactéria já resistente, por isso é tão importante que o tratamento seja prescrito e realizado corretamente.

Geralmente é assumido que isolados resistentes às drogas possuam um custo biológico (diminuição do *fitness*) em decorrência à aquisição da resistência (Billington *et al.*, 1999). Embora, teoricamente, seja assumido que a resistência gera um custo, na prática nem sempre isso ocorre e mesmo que cepas resistentes às drogas sofram uma redução inicial no *fitness*, elas continuam evoluindo através da aquisição de uma ou mais mutações em sítios secundários que podem melhorar ou até restaurar o *fitness* através do tempo, processo conhecido como evolução compensatória (Borrel and Gagneux, 2009).

Nesta tese, o *fitness* de alguns isolados clínicos de pacientes infectados com *M. tuberculosis* e diagnosticados entre 2005-2006 foi avaliado. No primeiro estudo (Capítulo 3) foram avaliadas 21 cepas MDR (com diferentes mutações nos genes: *rpoB*, *rpsL* e *katG*) e 4 sensíveis, incluindo a cepa padrão H37Rv, através de curvas de crescimento utilizando a redução da resazurina para quantificar o crescimento da bactéria medido por espectrofotômetro. No segundo estudo (Capítulo 4) foram avaliadas 78 cepas, sendo 20 sensíveis e 58 resistentes a pelo menos uma das drogas ou até a todas: RIF, INH, STR, KAN e OFL, e apresentando mutações nos genes *rpsL*, *rrs*, *gidB* e *rpoB*. Algumas cepas foram analisadas nos dois trabalhos. Em ambos dois parâmetros foram utilizados nas comparações: o tamanho da fase lag e o índice de crescimento (relacionado à fase log).

Em geral, analisando-se as curvas de crescimento, em ambos estudos as cepas com as mutações K43R em *rpsL* e S531L em *rpoB* ou cresceram melhor ou sem diferença do isolado sensível. Já os isolados com mutações em *rpoB*, mas não em S531L, e com mutações em mais de um gene cresceram em média mais lentamente que os isolados sensíveis. Em ambos estudos é possível afirmar que as mutações mais encontradas em isolados clínicos são as mutações não relacionadas com a perda do *fitness* ou que geram pouco custo biológico ao isolado, fato também já descrito por outros autores (Mariam *et al.*, 2004; Gagneux *et al.*, 2006b; Gagneux, 2009). Pode ser o próprio fato de ser uma mutação sem ou com baixo custo biológico que faz com que ela seja selecionada em isolados clínicos e por isso tenha tornado-se tão frequente em várias populações.

Os isolados mutados no gene *katG* em S315T, do primeiro estudo, tiveram valores heterogêneos de *fitness*, pois apresentaram mutações variáveis em outros genes, mas o que de mais importante pode-se concluir é que, quando os parâmetros de crescimento foram analisados entre os isolados mutados individualmente com a média dos isolados sensíveis, pode-se verificar que alguns isolados com a mutação S315T em *katG*, mas também em outros genes, cresciam mais rápido do que os isolados sensíveis (1 isolado: *rpsL43/katG315* e 3 isolados: *rpoB531/katG315*). A mutação S315T em *katG* já foi descrita como sem custo biológico para o isolado que a possui (Pym *et al.*, 2002).

Os isolados mutados em mais de um gene cresceram em média mais devagar nos dois estudos que os sensíveis, embora sem diferença estatística no parâmetro correspondente a fase log do segundo estudo. Um estudo confirma o fato dos isolados resistentes a múltiplas drogas terem um custo biológico associado com a resistência

(Davies *et al.*, 2000). Mesmo assim, alguns isolados individualmente, como os isolados citados anteriormente mutados em *katG* e outros genes (estudo 1) apresentaram um *fitness* medido nas curvas de crescimento melhor que a média para os isolados sensíveis.

No estudo 2, isolados competiram em um ambiente comum e diferentemente de outros estudos (Billington *et al.*, 1999; Mariam *et al.*, 2004), nesse não foram cepas parentais geradas em laboratório que competiram e sim isolados dos pacientes de TB entre os anos amostrados. Como resultado, o isolado sensível sempre apresentou um *fitness* melhor nesses ensaios do que o isolado mutante. O isolado sensível também apresentou um melhor *fitness* frente a isolados resistentes a RIF selecionados espontaneamente por Mariam *et al.* (2004) quando esses competiram com as cepas parentais e nos estudos de Billington *et al.* (1999) de nove experimentos, em apenas um o isolado resistente teve um *fitness* melhor que o isolado parental e sensível a RIF.

Quanto às diferentes linhagens, no primeiro estudo, onde um número pequeno de cepas foi analisado, os isolados classificados como LAM cresceram mais rápido no parâmetro tamanho da fase lag, mas sem nenhuma diferença na fase log para os isolados não-LAM (deve-se deixar claro que nesse estudo devido ao baixo número amostral não foi realizado teste estatístico). Já no segundo estudo o resultado foi diferente: as cepas não-LAM cresceram em média mais rapidamente, mas sem diferença estatística das cepas LAM (cabe salientar que neste caso pode ter havido uma diferença devido ao fato dos isolados LAM terem 13% (6/47) de isolados sensíveis e dos isolados non-LAM 45% (14/31)), os outros isolados possuíam mutações diversas que podem estar influenciando o *fitness*). Mas o que confirmou que as cepas não-LAM tem um *fitness* melhor, no segundo estudo, foram os ensaios de competição (embora poucos isolados tenham sido analisados). Como as cepas da linhagem LAM são as mais frequentes no Brasil (Brudey *et al.*, 2006), o resultado esperado seria o contrário. Estudos recentes salientam que linhagens principais de *M. tuberculosis* co-evoluíram e adaptaram-se as diferentes populações humanas (Gagneux *et al.*, 2006a), logo esse genótipo pode ser mais comum na população brasileira pois já está adaptado a ela e não por ter o crescimento mais rápido do que as outras linhagens. Mais isolados necessitam ser analisados para que esse achado seja confirmado.

Nesse estudo cepas clínicas isoladas de pacientes com tuberculose foram incluídas. Essas cepas apresentam um *background* genético distinto e desconhecido, e assim como o número de cepas é limitado os resultados devem ser interpretados com cuidado. O *fitness*

dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* estudados são muito heterogêneos, pois eles apresentam diferentes graus de resistência às drogas, diferentes mutações nos genes analisados e talvez em outros que nem foram analisados, como por exemplo: *embB* e *pncA*, genes relacionados com a resistência ao etambutol e pirazinamida, respectivamente (Zhang and Yew, 2009), e ainda diferentes genótipos. Logo, possíveis diferenças genéticas além das caracterizadas neste estudo podem estar influenciando os resultados obtidos. Sem contar que a evolução compensatória pode estar atuando para reduzir os custos da resistência às drogas nas cepas clínicas, e esse fator não foi medido no estudo. Embora seja muito importante estudar o *fitness* das amostras circulantes na população, o fato de ter tantas variáveis diferentes e desconhecidas, torna a conclusão vaga sobre qual variável seria a mais importante ou responsável pela diferença no *fitness*.

Para tentar controlar essas diversas variáveis envolvidas nesse tipo de estudo que vários autores tem utilizado abordagens de seleção de mutantes resistentes em laboratório (Billington *et al.*, 1999; Mariam *et al.*, 2004; Gagneux *et al.*, 2006b). Entretanto, nesse tipo de estudo mutações que nem são observadas *in vivo* podem acabar também sendo estudadas, permanecendo desconhecido o *fitness* das cepas circulantes de *M. tuberculosis*. Por isso novamente retornamos a importância de estudos com cepas clínicas distribuídas em uma população.

Para tentar reduzir as variáveis de confusão, o ideal seria estudar cepas clínicas que ao mesmo tempo tenham o mesmo *background* genético, como no caso de estudar isolados de pacientes que desenvolveram resistência durante o tratamento, assim, comparando a mesma cepa antes e depois do desenvolvimento da resistência.

Outro ponto importante é que apenas o parâmetro taxa de crescimento foi comparado nesse estudo, e sabe-se que vários outros componentes estão envolvidos no *fitness* de um organismo, como a capacidade de ser transmitido e a virulência da cepa em questão. Consequentemente, outros estudos visando esses outros aspectos devem ser realizados para confirmar ou não esses achados.

PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados aqui levantaram algumas questões que podem ser investigadas futuramente:

Gene *gidB*

Para um melhor conhecimento sobre quais mutações em *gidB* estariam relacionadas com a resistência a baixo nível a estreptomicina em *M. tuberculosis*, mais isolados necessitam ser estudados. O mesmo precisa ser feito para que se confirme os polimorfismos descritos nesse mesmo gene em amostras de regiões diferentes das já estudadas.

Estudos de *fitness*

Para uma melhor compreensão sobre esse assunto, seria importante acompanhar pacientes que falham o tratamento e selecionam cepas resistentes. O estudo do *fitness* da mesma cepa antes e depois de desenvolver a resistência poderá ajudar a reduzir os problemas gerados na comparação de isolados com características bastante diferentes. Seria interessante, também, acompanhar a evolução da doença em pacientes que possuem MDR-TB para um melhor entendimento sobre a virulência das cepas já estudadas nos ensaios de *fitness*.

Para confirmar os achados de que a cepa da linhagem não-LAM teria vantagem sobre a cepa da linhagem LAM, seria necessário estudar mais cepas das linhagens LAM e não-LAM.

REFERÊNCIAS

- Billington OJ, McHugh TD and Gillespie SH (1999) Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1866–1869.
- Borrel S and Gagneux S (2009) Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 13:1456–1466.
- BRASIL (2010) Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de Controle da Tuberculose.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V et al (2006) *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 6:23.
- Brzostek A, Sajduda A, Sliwinski T, Augustynowicz-Kopec E, Jaworski A, Zowolska Z and Dziadek J (2004) Molecular characterisation of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *Int J Tuberc Lung Dis* 8:1032-1035.
- Comas I, Homolka S, Niemann S and Gagneux S (2009) Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS ONE* 4:e7815.
- Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC, Palaci M, Telles MA, Ritacco V et al (2009) Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol* 9:39.
- Davies AP, Billington OJ, Bannister BA, Weir WR, McHugh TD and Gillespie SH (2000) Comparison of fitness of two isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, one of which had developed multi-drug resistance during the course of treatment. *J Infect* 41: 184–87.
- De la Iglesia AI and Morbidoni HR (2006) Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Rev Argent Microbiol* 38:97-109.
- Drobniewski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V, Ruddy M, Kuznetzov S, Zakharova S, Melentyev A and Fedorin I (2005) Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *JAMA* 293: 2726-31.

- Fukuda M, Koda H, Ohno H, Yang B, Hirakata Y, Maesaki S, Tomono K, Tashiro T and Kohno S (1999) Relationship between genetic alteration of the *rpsL* gene and streptomycin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Antimicrob Chemother* 43:281-284.
- Gagneux S (2009) Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol Infect* 15:66–68.
- Gagneux S and Small PM (2007) Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 7:328–337.
- Gagneux S, DeRiemer K, Vanb T, Kato-Maedab M, de Jong BC, Narayanang S, Nicolh M, Niemanni S, Kremer K, Gutierrez MC et al (2006a) Variable host–pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 103:2869-2873.
- Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK and Bohannan BJ (2006b) The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 312: 1944–1946.
- Kubica T, Agzamova R, Wright A, Aziz MA, Rakishev G, Bismilda V, Richter E, Rüscher-Gerdes S and Niemann S (2005) The Beijing genotype is a major cause of drug-resistant tuberculosis in Kazakhstan. *Int J Tuberc Lung Dis* 9:646-53.
- Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE and Andersson DI (2004) Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1289–1294.
- Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y, Tokuyama S, Suzuki Y and Ochi K (2007) Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol Microbiol* 63:1096-1106.
- Pym AS, Saint-Joanis B and Cole ST (2002) Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun* 70:4955–4960.
- Riska PF, Jacobs WR and Alland D (2000) Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 4:S4-S10.
- Spies FS, da Silva PE, Ribeiro MO, Rossetti ML and Zaha A (2008) Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2947-2949.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN and Musser JM (1997) Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1024-1026.

- Via EL, Cho S, Hwang S, Bang H, Park SK, Kang HS, Jeon D, Min SY, Oh T, Kim Y et al (2010) Polymorphisms associated with resistance and cross-resistance to aminoglycosides and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from South Korean patients with drug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol* 48:402-411.
- Victor TC, van Rie A, Jordaan AM, Richardson M, van der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD and Warren R (2001) Sequence polymorphism in the *rrs* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is deeply rooted within an evolutionary clade and is not associated with streptomycin resistance. *J Clin Microbiol* 39:4184-4186.
- Victor TC, Haas PEW, Jordaan AM, van der Spuy GD, Richardson M, van Soolingen D, van Helden PD and Warren R (2004) Molecular characteristics and global spread of *Mycobacterium tuberculosis* with a western cape F11 genotype. *J Clin Microbiol* 42:769-772.
- Zhang Y and Yew WW (2009) Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 13:1320-1330.

Capítulo 6

Anexo

ANEXO 1. Tabela com os resultados de MIC, mutações nos genes estudados e genotipagem para as 106 cepas estudadas.

Número	resistência^a	mutações^b	linhagem	SIT^c
	MIC	rpsL/rrs/gidB/rpoB/katG		
500070	-	-/-/-/nd	H3	50
500121	-	-/-/-/nd	NÃO LAM	450
500193	-	-/-/-/nd	NÃO LAM	4
500201	R H S	K43R/-/-/S315T	T5_MAD2	58
500251	-	-/-/-/nd	H3	50
500270	-	-/-/L16R/-/-	LAM1	729
500281	R H S	-/513C-T/-/S531L/S315T	LAM5	93
500294	R H S	K43R/-/L16R/-/S315T	LAM	ne
500425	R H S	-/513C-T/-/S531L/S315T	H1	47
521009	-	-/-/-/nd	H3	50
521015	-	-/-/L16R/-/nd	LAM1	729
521068	H S	-/513C-T/L16R/H526L/nd	LAM9	42
521099	-	-/-/L16R/-/nd	LAM1	729
521108	-	-/-/-/nd	H3	99
521121	S	K43R/-/-/nd	H3	50
521144	R H S	-/-/L16R/S531L/nd	LAM5	93
521156	-	-/-/-/nd	T1	65
600007	R H	-/-/L16R/S531L/S315T	LAM9	42
600029	R H K	-/-/L16R/H526D/nd	LAM2	17
600031	-	-/-/-/nd	T1	53
600052	H S	-/-/G30R/-/nd	S	34
600064	R H	-/-/L16R/S531L/nd	LAM2	826
600066	R H S K	-/-/L16R,P84L/S531L/nd	LAM4	60
600074	R H	-/-/L16R/S531L/nd	LAM5	93
600082	S	-/-/L16R,G117E/-/nd	LAM9	42
600146	S	K43R/-/L16R/-/nd	LAM	ne
600195	-	-/-/-/nd	T1	65
600208	R H S	-/-/L16R/-/nd	LAM1	729
600254	-	-/-/-/nd	T1	244
600305	R H S	-/-/H48Y/D516V/nd	T1	244
600313	R H	-/-/L16R/S531W/nd	LAM9	42
600339	R H S	K43R/-/L16R/Q510H,H526Y/nd	LAM6	64
600356	R H	-/-/L16R/L533P/nd	LAM2	17
600382	R H	-/-/L16R/S531L/nd	LAM2	17
600484	R H S K	-/491C-T/L16R,A200E/H526D/nd	LAM	106
600488	-	-/-/-/nd	X2	137
600525	R H K	-/-/L16R/S531L/nd	LAM4	60
600599	R H K	-/-/L16R/S531L/-	LAM9	42
600726	R H S	-/-/L16R/S531L/S315T	LAM5	93
600730	S	-/-/39 frameshift (delC115)/-/nd	NÃO LAM	2640
600772	-	-/-/L16R/-/nd	LAM1	729
600792	S	-/904C-G/-/-/nd	NÃO LAM	237
600793	R H	-/-/-/S531L/nd	NÃO LAM	ne
600807	R H S	-/-/L16R,W45S/-/nd	LAM1	20
600811	R H K	-/-/L16R/H526Y/nd	LAM2	17
600813	-	-/-/-/nd	T2	853
600853	R H	-/-/34 frameshift (delG100)/H526L/nd	NÃO LAM	ne

600878	-	-/-/-/nd	H3	3
600954	-	-/-/-/nd	T3	37
600957	S	-/-L16R/-/nd	LAM9	42
621001	R H S	-/491C-T/L16R/H526D/nd	LAM3	33
621002	S	-/-/-/nd	H3	50
621009	-	-/491C-T/L16R/-/nd	LAM3	33
621013	R H S	-/-L16R/S531L/nd	LAM	ne
621023	-	-/-/-/nd	NÃO LAM	1659
621028	S H	-/-N51T/-/nd	X1	119
621031	S	-/-L49P/-/nd	H3	50
621036	-	-/-/-/nd	H3	99
621042	-	-	T3	158
621044	R H	-/-L16R/S531L/S315T	LAM5	93
		L81L/905A-G/117 frameshift		
621047	R H S K	(insG350)/H526Y/S315T	H3	50
621049	R H	-/-L16R/S531L/S315T	LAM5	93
621052	R H S	K43R/-/-S531L/S315T	T5_MAD2	58
621058	R H S	-/-L16R/H526Y/nd	LAM9	42
621071	R H	-/-L16R/S531L/nd	LAM2	17
621078	R H	-/-L16R/S531L/nd	LAM5	93
621087	R H	-/-L16R/ins516/S315T	LAM	863
621100	R H	-/-L16R/S531L/nd	LAM5	93
621103	R H S	-/491C-T/L16R/S531L/nd	LAM3	33
621108	S	-/-G164C/-/nd	T1	65
621109	H	-/-L16R/-/nd	LAM2	17
621113	-	-/-L16R/-/	LAM2	179
621115	R H S K O	K43R/-/-H526R/nd	T5_MAD2	58
621118	R H K	-/-L16R/D516Y/nd	LAM	396
621122	-	-/-/-/nd	H2	2
621137	H S	-/491C-T/L16R/-/nd	LAM3	33
621155	R H K	-/-L16R/H526D/nd	LAM	2512
621161	R H S	K88R/-/L16R,A183T/S531L/nd	LAM5	93
621164	R H	-/-L16R/S531L/S315T	LAM5	93
621169	R H K	-/-/-H526D/nd	T1	65
621170	S	-/-L16R,L79F/-/nd	LAM9	42
621172	R H S K	K43R/-/-H526Y/S315T	T5_MAD2	58
621173	R H S K	K43R/-/L16R/S531L/S315T	LAM6	64
621180	-	-/-/-/nd	NÃO LAM	ne
621191	S H	-/-L16R,C52stop/-/nd	LAM9	42
621192	R H	-/-/-H526P/S315T	NÃO LAM	ne
621201	R H	-/-L16R/H526Y/nd	LAM9	42
621202	R H S	-/-L16R/S531L/nd	LAM9	42
621204	-	-/-/-/nd	NÃO LAM	1659
621206	R H	-/-/-H526D/nd	H1	47
621207	R H	-/491C-T/L16R,V115G/S531L/nd	LAM	106
621211	R H	-/-/-/nd	T1	53
621216	R H	-/-L16R/S531L/nd	LAM1	729
621220	R H	-/-L16R,P84L/S531L/nd	LAM4	60
621225	-	-/-/-H526D/nd	S	34
621226	R H	-/-L16R/Q513E/nd	LAM1	729
621229	H	-/-L16R/-/nd	LAM	863
621230	R H	-/-L16R/S531L/S315T	LAM5	93

621237	R H	-/-/L16R,P93R/S531L/nd	LAM1	20
621239	S	-/-/L16R/-/nd	LAM9	177
621241	R H	-/-/L16R/S531L/S315T	LAM5	93
621242	R H	-/-/L16R/S531L/S315T	LAM5	93
621248	R H	-/-/L16R/H526V/nd	LAM6	64
621257	R H	-/-/L16R/ins516/S315T	LAM	863
6001039	R H S	K43R/-/-H526D/nd	T5_MAD2	58
6001061	R H	-/-/L16R,S100F/S531L/S315T	LAM5	93

^a resistência determinada de acordo com o método REMA. -, sensível; R, rifampicina; H, isoniazida; S, estreptomicina; K, kanamicina e O, ofloxacina.

^b nd, mutação não determinada; -, isolado sem mutação no gene em questão.

^c SIT, tipo internacional compartilhado; ne, genótipo ainda não descrito na base de dados.